



## **Pesquisa de fitoplasmas das pomóideas e prunóideas em Portugal**

**Ana Isabel Ambrósio Marques**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Agronómica – Protecção das Plantas**

Orientador: Doutora Esmeraldina Agostinho Nascimento de Sousa

Co-orientador: Doutor António Maria Marques Mexia

### **Júri:**

Presidente: Doutor José Luís Monteiro Teixeira, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor António Maria Marques Mexia, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Eugénia Maria Antunes de Andrade, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P.

Doutora Esmeraldina Nascimento Agostinho de Sousa, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P.

Lisboa, 2011

## **Agradecimentos:**

Agradeço à Presidente do INRB/I.P. (Doutora Rosa Sá), à directora do L-INIA (Doutora Fátima Calouro) e à Coordenadora da UIPP (Doutora Amélia Lopes) por possibilitarem a realização deste estágio nos laboratórios da UIPP/L-INIA/INRB.

Seguidamente agradeço à orientadora Esmeraldina Sousa (Investigadora Auxiliar do INRB/I.P.) pela orientação técnico/científica e por toda a ajuda prestada, assim como ao pessoal de laboratório, Engenheira Céu Mimoso e Dona Isaura Velez.

Agradeço ao professor e coorientador António Mexia por aceitar o que à partida seria um risco.

Ao Engenheiro Carlos Matias da AVAPI que, apesar de reformado, quando solicitado, disponibilizou-se para capturar psilas e auxiliar na sua classificação.

Um agradecimento muito especial à Doutora Eugénia de Andrade e à Engenheira Clara Fernandes, por tudo o que fizeram por mim, tanto na parte profissional como pessoal.

Não menos importantes e participativos, os meus pais por todas as vezes que me ajudaram no campo a “apanhar psilgas”.

Ao Acácio Rosa e ao Stephen Figueira por permitirem a invasão do pomar pela família Marques e permitirem a captura de insectos.

Ao IRTA (“Investigación y Tecnología Agroalimentarias”) de Barcelona, pela possibilidade de realização de um estágio de uma semana no Departamento de Protecção de Plantas.

Um agradecimento especial à Doutora Amparo Laviña e ao Eng.º Jordi Sabaté por nos terem levado a visitar pomares infectados com PD, demonstrado a execução do protocolo de colheita de psilas, realizado a identificação em laboratório e extracção de ácido nucleico dos insectos capturados. À Doutora Amparo Laviña agradeço também por nos ter acolhido em sua casa, tão generosamente.

Ao João Fernandes por estar lá quando mais precisei, e a todos os meus amigos que tanto aturaram nestes meses infundáveis e pela ajuda que deram, cada um à sua maneira.

## **Resumo:**

Os fitoplasmas são organismos unicelulares, procariotas, sem parede celular que causam doenças em centenas de espécies vegetais. Não existindo tratamento curativo, a sua detecção pela utilização de testes de diagnóstico sensíveis torna-se fundamental para o seu controlo.

O estudo incidiu na prospecção dos fitoplasmas “*Candidatus*” fitoplasma pyri, “*Candidatus*” fitoplasma mali e “*Candidatus*” fitoplasma prunorum, agentes etiológicos de PD, AP e ESFY, transmitidos pelos psílídeos *Cacopsylla pyri*, *Cacopsylla picta* e *Cacopsylla pruni*, respectivamente. Pertencem ao grupo AP ou 16SrX e considerados organismos de quarentena (lista A2, OEPP).

Foram comparados dois métodos de extracção de DNA e dois métodos de identificação por recurso a PCR. Os métodos de extracção diferem no tampão de lise, aparentando ser crucial na obtenção de DNA de elevada qualidade. O método de identificação mais utilizado, até recentemente, é o nested-PCR mas, por ser um método moroso e dispendioso está a ser substituído pelo real-time PCR, mais rápido, eficaz e menos dispendioso, tendo sido comprovado neste trabalho.

Foram analisadas amostras de material vegetal e de insectos provenientes de pomares de pomóideas e prunóideas da região Oeste.

De relevante importância temos o facto de, pela primeira vez, se reportar a presença de “*Candidatus*” fitoplasma pyri em insectos e plantas.

**Palavras-chave:** fitoplasmas, grupo 16SrX, psílídeos, nested-PCR, real-time PCR, “*Candidatus*” fitoplasma pyri

**Abstract:**

Phytoplasmas are unicellular organisms, prokaryotes, cell wall-less that cause diseases in hundreds vegetable species.

This study is mainly about the prospection of “*Candidatus*” phytoplasma pyri, “*Candidatus*” phytoplasma mali and “*Candidatus*” phytoplasma prunorum, etiologic agents of PD, AP e ESFY, vectored by psyllids *Cacopsylla pyri*, *Cacopsylla picta* e *Cacopsylla pruni*, respectively. These three phytoplasmas belong to AP or 16SrX group, considered quarantine organisms (A2 list, EPPO).

In this study, two DNA extraction methods as well as two identification methods using PCR were compared. The two extraction methods differ in lyses buffer which seems to be crucial to obtain high quality DNA. The most used identification method until recently is nested-PCR but as it is a time consuming and expensive method, it's being replaced by real-time PCR a quicker, more viable and less expensive one, as it was confirmed in this study.

Plant and insect samples from pome and prunus fruit trees in Oeste area were analysed.

With major importance lies the fact that, for the first time, we report the presence of “*Candidatus*” phytoplasma pyri in insect and plant samples.

**Key words:** phytoplasmas, 16SrX group, psyllids, nested-PCR, real-time PCR, “*Candidatus*” phytoplasma pyri

## Extended Abstract:

All over the world over than a thousand phytoplasma-associated diseases is known, causing high economic losses (Seemüller & Schneider, 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively, 2004). They affect all kind of plant species, such as vegetables, fruit trees and ornamental plants.

There is no treatment to this kind of organisms which makes them important to control, being most of them included in EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization – quarantine list.

Traditionally, phytoplasma detection in diseased plants was made by electronic microscopy. Throughout the years, biomolecular techniques were developed to detect and identify phytoplasmas, where the most important is PCR (Polymerase Chain Reaction) for detection complemented with RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) for identification. Recently, a new technique that doesn't involve multiple manipulations is being optimized – real-time PCR. This technique allows detecting and identifying the phytoplasma in study, as well as providing its DNA concentration in one single reaction.

Fruit trees' phytoplasmas are wide spread, mainly in Europe, and cause severe fruit production losses. This study concerned the AP or 16SrX group that gathers three major phytoplasmas: "Candidatus" phytoplasma mali, "Candidatus" phytoplasma pyri and "Candidatus" phytoplasma prunorum, etiological agents of Apple Proliferation and Pear Decline in pome fruit trees and European Stone Fruit Yellows in prunus fruit trees. These fitoplasmas are vectored by psyllids *Cacopsylla picta*, *Cacopsylla pyri* and *Cacopsylla pruni*, respectively.

Until now, there is no evidence of any of these diseases in Portugal, as well as its vectors, except for *Cacopsylla pyri*, the only one reported until now in Portuguese pear orchards.

Portuguese pear cv. Rocha orchards are a very important symbol to Portuguese agriculture. Pear Rocha is exported worldwide, representing a major income in Portuguese economy. Due to its importance, it is mandatory to control all diseases infecting pear trees. As *Cacopsylla pyri* is very abundant in Portuguese pear orchards and cause severe damages by itself, it is important to know if the insect or the trees are infected with PD. The main goal is, as there are no previous reports of this disease, prevent and control future spread.

As the other two vectors were never found in Portugal, one of the goals of this study was to look for them in apple orchards (where *Cacopsylla picta* feeds) and prunus (peach, apricot, and cherry) orchards (where *Cacopsylla pruni* feeds). The search was not successful

so testing for AP and ESFY phytoplasmas was limited to vegetal samples, all negative for Portuguese orchards.

What concerns PD, testing involved insect and vegetal samples and the results were somehow different than to the previous phytoplasmas. Some of the captured insects revealed to be positive for the phytoplasma, as well as one tree sample. The positive results, obtained by nested-PCR were confirmed by RFLP, nucleotide sequencing and PD specific real-time PCR. These results require immediate attention by responsible agricultural departments as it a quarantine phytoplasma.

This study presents as well a comparison between two DNA extraction methods and between nested-PCR and real-time PCR. The two DNA extraction methods differed in lyses buffer being the comparison between PGB and CTAB analyzing which method origins a purer DNA with high quality, decreasing the presence of inhibitors which are crucial for PCR amplification. High inhibitors concentration may inhibit DNA amplification by PCR.

When comparing the two methods, results show that real-time PCR is a quicker and cheaper technique and most important of all more sensitive as it can amplify samples with low DNA concentration.

## Índice

I.	Introdução .....	1
I.1.	Fitoplasmas .....	1
I.1.1.	Classificação e características .....	1
I.1.2.	Caracterização molecular .....	3
I.1.3.	Morfologia e estrutura .....	3
I.1.4.	Multiplicação e transmissão .....	4
I.1.5.	Hospedeiros .....	5
I.1.6.	Interacção fitoplasma-insecto-hospedeiro .....	5
I.1.7.	Especificidade fitoplasma-insecto-hospedeiro .....	6
I.1.8.	Dispersão dos vectores .....	7
I.1.9.	Sintomas em plantas infectadas .....	7
I.1.10.	Medidas de controlo .....	8
I.2.	Os fitoplasmas em estudo .....	9
I.2.1.	" <i>Candidatus</i> " fitoplasma pyri, " <i>Candidatus</i> " fitoplasma mali e " <i>Candidatus</i> " fitoplasma prunorum .....	9
I.3.	Situação dos pomares de pomóideas e prunóideas em Portugal .....	10
I.4.	"Pear Decline" .....	14
I.4.1.	Dispersão .....	14
I.4.2.	Plantas hospedeiras .....	15
I.4.3.	Sintomas .....	16
I.4.4.	Distribuição do fitoplasma na árvore .....	18
I.4.5.	Transmissão .....	18
I.4.6.	O vector .....	18
I.4.6.1.	Evolução .....	18
I.4.6.2.	Morfologia e Biologia .....	19
I.4.6.3.	Danos causados .....	20
I.4.6.4.	Medidas de profilaxia .....	20
I.4.6.5.	Nível económico de ataque .....	21
I.4.7.	Diagnóstico .....	21
I.4.7.1.	Extracção do ácido nucleico total (ANt) .....	21
I.4.7.2.	PCR ( "Polymerase Chain Reaction") .....	23
I.4.7.2.1.	Nested-PCR .....	24
I.4.7.3.	Electroforese .....	25
I.4.7.4.	Real-time PCR .....	25
I.4.7.5.	Sequenciação nucleotídica .....	26

I.4.7.6. RFLP .....	26
II. Objectivos .....	27
III. Material e Métodos .....	28
III.1. Material .....	28
III.1.1. Material Vegetal .....	28
III.1.2. Material Animal .....	29
III.1.2.1. Método de captura.....	29
III.1.2.2. Locais de captura.....	30
III.1.2.3. Classificação dos insectos .....	30
III.2. Métodos .....	31
III.2.1. Extracção do ácido nucleico total .....	31
III.2.1.1. Plantas.....	31
III.2.1.1.1. Método CTAB .....	31
III.2.1.1.2. Método PGB/CTAB.....	33
III.2.1.2. Insectos .....	34
III.2.2. Leitura da concentração dos ácidos nucleicos .....	35
III.2.2.1. Por espectrofotometria .....	35
III.2.2.2. Por PicoGreen .....	36
III.2.3. Amplificação do DNA por PCR convencional .....	37
III.2.3.1. Amplificação do DNA de fitoplasma por nested-PCR .....	37
III.2.3.2. Amplificação do DNA de insecto .....	39
III.2.4. Electroforese .....	39
III.2.5. Amplificação do DNA por Real-Time PCR.....	41
III.2.5.1. Amplificação do DNA de planta (gene COX) .....	41
III.2.5.2. Método "Christensen" .....	42
III.2.5.3. Método NIB.....	42
III.2.6. Sequenciação e identificação de ácido nucleico amplificado .....	43
III.2.7. RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") .....	43
III.2.7.1. RFLP virtual .....	43
III.2.7.2. RFLP real.....	44
IV. Resultados e discussão .....	45
IV.1. Comparação de métodos.....	45
IV.1.1. Comparação de métodos de extracção, quantificação e purificação de ácido nucleico em amostras de material vegetal proveniente da testemunha doente .....	45
IV.2. Resultado das análises ao material vegetal .....	54
IV.2.1. Amostras colhidas em Alcobaça.....	54



IV.2.2. Pesquisa de fitoplasmas nas amostras pertencentes à Colecção Nacional de Fruteiras.....	55
IV.3. Resultados da análise aos insectos .....	56
IV.3.1. Quantificação de insectos por pomar de captura .....	56
IV.3.2. Identificação de <i>Cacopsyla pyri</i> (L.).....	57
IV.3.3. Análises .....	58
IV.4. Sequenciação.....	65
IV.5. RFLP .....	67
IV.6. Análise de custos.....	68
V. Conclusões .....	69
VI. Bibliografia.....	70

## Índice de quadros

Quadro 1: Pomares de frutos frescos por região (2009) (fonte: RGA, 2009/INE, 2011) .....	11
Quadro 2: Dimensão média dos pomares de frutos frescos (1999-2009) (fonte: RGA, 2009/INE, 2011) .....	12
Quadro 3: Origem, variedade e data de colheita das amostras de material vegetal analisadas .....	28
Quadro 4: Localização dos pomares da região Oeste onde foram capturados insectos e respectivas datas de captura.....	30
Quadro 5: Identificação dos tubos das amostras de psilas submetidas a análise por PCR, indicando o género e data de extracção das mesmas .....	35
Quadro 6: Volumes necessários para efectuar a recta de calibração padrão na quantificação do DNA das amostras da testemunha doente .....	37
Quadro 7: Concentração e quantidade de reagentes para a "mix" de reacção para nested-PCR .....	38
Quadro 8: Programa de amplificação para os iniciadores P1-P7 e f01-r01 .....	38
Quadro 9: Concentração e quantidade de reagentes para a "mix" de reacção para amplificação de DNA de insecto com os iniciadores LCO1490 e HC02198 .....	39
Quadro 10: Concentração de DNA nas amostras de macieira infectada obtida por Fluorimetria. As reacções ocorreram num volume total de 50 µL e com 5 µL de suspensão de DNA.....	45
Quadro 11: Valores da concentração de DNA e contaminantes (A260/A280) obtidos por espectrofotometria, com diluição de 1:50 dos ácidos nucleicos.....	46
Quadro 12: Análise de variância a 2 factores com repetição para a razão A260/A280 (pureza do ácido nucleico) obtida por espectrofotometria, com $\gamma = 0,05$ . .....	47
Quadro 13: Análise de variância a 2 factores com repetição para concentração de DNA obtida por espectrofotometria, com $\gamma = 0,05$ .....	47
Quadro 14: Análise de variância a 2 factores com repetição para concentração de DNA obtida por fluorimetria, com $\gamma = 0,05$ .....	48
Quadro 15: Resultados em Ct das amostras concentradas e diluídas, obtidos pela amplificação do gene COX por real-time PCR e o módulo da sua diferença. ....	50
Quadro 16: Análise de variância a 2 factores, com repetição, para $\gamma = 0,05$ comparando os valores obtidos na amplificação do gene COX por real-time PCR .....	51
Quadro 17: Resultados em Ct das amostras concentradas e diluídas, obtidos pela amplificação do DNA por real-time PCR utilizando o método Christensen e o módulo da sua diferença. ....	52

Quadro 18: Análise de variância a 2 factores, com repetição, para $\gamma = 0,05$ comparando os valores obtidos na amplificação do DNA por real-time PCR, utilizando o método Christensen .....	53
Quadro 19: Quantificação dos insectos por pomar de captura .....	56
Quadro 20: Resultados em Ct das amostras concentradas, obtidos pela amplificação do DNA de insectos por real-time PCR, utilizando o método "Christensen" .....	62
Quadro 21: Resultados em Ct das amostras concentradas, obtidos pela amplificação do DNA de insectos por real-time PCR, utilizando o método NIB .....	64
Quadro 22: Resultados do alinhamento da sequência "consensus" obtida com sequências integrantes da base de dados GenBank.....	65
Quadro 23: Locais de corte da sequência " <i>consensus</i> ", obtida com os iniciadores f01-r01, pelas enzimas <i>Sspl</i> e <i>Sfcl</i> .....	67
Quadro 24: Custos totais, até alcançar o diagnóstico final, para uma reacção de real-time PCR e uma reacção de nested-PCR .....	68

## Índice de figuras

Figura 1: Composição dos pomares de frutos frescos em 2009 (fonte: RGA, 2009/INE, 2011)	10
Figura 2: Área de pomar de frutos frescos, por classes de dimensão em 2009 (fonte: RGA, 2009/INE, 2011)	12
Figura 3: Superfície de pomóideas, pessegueiros e cerejeiras	13
Figura 4: Dispersão mundial do “Pear Decline” (fonte: <a href="http://www.plantwise.org/">http://www.plantwise.org/</a> )	14
Figura 5: Dispersão europeia do “Pear Decline” (fonte: <a href="http://www.plantwise.org/">http://www.plantwise.org/</a> )	15
Figura 6: Descoloração precoce da folhagem	17
Figura 7: Avermelhamento da folhagem	16
Figura 8: Declínio rápido da pereira	17
Figura 9: Esquematização do método nested-PCR	24
Figura 10: Técnica das pancadas em pereira para a obtenção de adultos de <i>Cacopsylla pyri</i>	29
Figura 11: Divisão dos insectos por género para extracção do DNA total	30
Figura 12: Esmagamento de material vegetal em saco Bioreba com maço	32
Figura 13: Produto macerado e aspecto final da fase líquida, evidenciando as diferenças entre variedades	32
Figura 14: Maceração dos insectos em tubo de polipropileno	34
Figura 15: Espectrofotómetro Biorad: “SmartSpec 3800, utilizado para medir as concentrações de ácido nucleico total e contaminantes presentes nas amostras	36
Figura 16: Termociclador de PCR convencional, “Programmable Thermal Controller” 100 da “MJ Reserach”	38
Figura 17: Corrida electroforética de amostras com uma tensão constante de 100 V	40
Figura 18: Leitor de UV (Fluor S Multimager Biorad) utilizado na leitura do gel de electroforese	40
Figura 19: Termociclador Rotor-Gene 6000Q para real-time PCR, conectado ao computador e aspecto dos diferentes carrosséis possíveis de utilizar	41
Figura 20: Curvas de fluorescência que ilustram a amplificação em tempo-real do fragmento do gene Cox. A fluorescência registada para cada amostra é aquela que atinge um limiar de detecção (linha horizontal a vermelho) por convenção denominado de Ct. A figura mostra as curvas de fluorescência de todas as amostras testadas em duplicado. A fluorescência emitida antes do nível do Ct para cada curva é considerada ruído de fundo ( <i>background</i> )	49
Figura 21: Curvas de fluorescência em escala logarítmica que ilustram a amplificação em tempo-real do fragmento do gene Cox	49

Figura 22: Curvas de fluorescência que ilustram a amplificação em tempo-real pelo método Christensen. A fluorescência registada para cada amostra é aquela que atinge um limiar de detecção (linha horizontal a vermelho) por convenção denominado de Ct. A figura mostra as curvas de fluorescência de todas as amostras testadas em duplicado. A fluorescência emitida antes do nível do Ct para cada curva é considerada ruído de fundo ( <i>background</i> ). .51	51
Figura 23: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído da testemunha doente proveniente de macieira infectada.....53	53
Figura 24: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de várias amostras de material vegetal provenientes de Alcobaça. ....54	54
Figura 25: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de amostras provenientes da Coleção Nacional de Fruteiras e de dois pomares abandonados (poços 29 e 30) .....55	55
Figura 26: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de amostras provenientes da Coleção Nacional de Fruteiras.....55	55
Figura 27: Macho de <i>Cacopsylla pyri</i> (L.) ..... 57	57
Figura 28: Fêmea de <i>Cacopsylla pyri</i> ( L.) .....57	57
Figura 29: Vários instares ninfais de <i>Cacopsylla pyri</i> (L.) .....57	57
Figura 30: Pormenor de uma das ninfas.....57	57
Figura 31: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção da subunidade I do gene mitocondrial da citocromo c oxidase, fragmento de cerca de 710 pb da por amplificação de um fragmento de 710pb por PCR convencional, utilizando os primers LCO1490 - HC02198 a partir do DNA extraído de amostras de insectos capturados na zona oeste. ....58	58
Figura 32: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste.....59	59
Figura 33: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste (Martim Joanes) .....59	59

Figura 34: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste. ....	60
Figura 35: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste. ....	60
Figura 36: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste.(repetição de amostras positivas, obtidas no PCR anterior (Fig 32, 33) ) .....	61
Figura 37: Curvas de fluorescência que ilustram a amplificação do DNA de alguns insectos, em tempo-real pelo método Christensen. A fluorescência registada para cada amostra é aquela que atinge um limiar de detecção (linha horizontal a vermelho) por convenção denominado de Ct. ....	61
Figura 38: Curvas de fluorescência que ilustram a amplificação do DNA de alguns insectos, em tempo-real pelo método NIB. A fluorescência registada para cada amostra é aquela que atinge um limiar de detecção (linha horizontal a vermelho) por convenção denominado de Ct. ....	64
Figura 39: Padrão electroforético da digestão do produto PCR obtido com os iniciadores f01-r01, de três amostras positivas, utilizando as enzimas de restrição <i>Sfcl</i> (a vermelho) e <i>Sspl</i> (a amarelo).....	67
Figura 40: Comparação de tempo utilizado para chegar ao diagnóstico final em nested-PCR e em real-time PCR. P: Tempo para manipulação das amostras – diluições, encher tubos de reacção; qPCR: real-time PCR; DA: análise de dados obtidos; nPCR: nested-PCR; E: electroforese; RED: RFLP (Fonte: Nicolić <i>et al.</i> , 2010) .....	68

## Lista de abreviaturas

$\lambda$ DNA	“lambda DNA”
$\mu$ m	Micrometro
AAY	“American Aster Yellows”
AN	Ácido nucleico
ANt	Ácido nucleico total
AP	“Apple Proliferation”
ATP	Adenosina tri-fosfato
AVAPI	Associação para a Valorização Agrícola em Produção Integrada
AY	“Aster Yellows”
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
C	Base citosina
cl.	Clone
Ct	“threshold cycle”
CTAB	“Cetyl trimethylammonium bromide”
cv.	Cultivar
DNA	“Deoxyribonucleic acid”
dsDNA	“double strain DNA”
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPPO	“European and Mediterranean Plant Protection Organization”
ESFY	“European Stone Fruit Yellows”
FAM	6-carboxifluoresceína
FD	“ <i>Flavescence dorée</i> ”
G	Base guanina
INIAP	Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas
INRB	Instituto Nacional de Recursos Biológicos
IRTA	“Investigación y Tecnología Agroalimentarias”
Kb	Kilo-bases
MGB	“Minor groove binder”
MLO	“Mycoplasma-like organisms”
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIB	“National Institute of Biology”
nm	Nanómetros
NTC	“Non Template Control”
OEPP	Organização Europeia e Mediterrânea de Protecção de Plantas
PCR	“Polymerase chain reaction”
PD	“Pear Decline”
PGB	“Phosphate grind buffer”
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA	“Ribonucleic acid”
rRNA	RNA ribossomal
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAMRA	“Tetra-methylcarboxyrhodamine”
TBE	Tris-Borato-EDTA
tDNA	DNA de transferência
UIPP	Unidade de Investigação de Protecção de Plantas
UNG	“uracil-DNA glycosylases”
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
UV	Ultravioleta
V	Volts

## **I. Introdução**

Durante décadas, por todo o mundo, as doenças conhecidas como "yellows" (amarelos) e "witches broom" (vassoura de bruxa) foram atribuídas aos vírus (Hogenhout *et al.*, 2008). No entanto, não haviam partículas virais visíveis em tecidos doentes ou isoladas de plantas infectadas (Lee *et al.*, 1992), assim como o agente causal era impossível de cultivar em meio artificial (Doi *et al.*, 1967).

A primeira prova de que as doenças em estudo não poderiam ser causadas por vírus partiu de Doi *et al.* (1967), quando observou estruturas arredondadas, semelhantes aos já conhecidos patógenos atribuídos a animais, os micoplasmas. Assim, para patógenos das plantas criou-se o termo MLO ("Mycoplasma-like organisms") que, mais tarde, foi substituído por fitoplasma ou espiroplasma. O termo fitoplasma só foi atribuído em 1994 pelo "Phytoplasma Working Team" no 10º Congresso da Organização Internacional de Micoplasmologia e, assim, utilizado (Hogenhout *et al.*, 2008) até 2004, quando foi proposta a integração dos fitoplasmas num novo género "*Candidatus phytoplasma*". Um fitoplasma pode ser descrito como novo "*Candidatus phytoplasma*" se tiver menos de 97,5% de semelhança com qualquer outro "*Candidatus phytoplasma*" previamente identificado. Nos casos em que se verifica uma similaridade maior ou igual que 97,5% na sequência do gene 16SrDNA, a descrição como uma nova espécie "*Candidatus phytoplasma*" ainda é possível. Só é recomendada caso estes fitoplasmas representem, claramente, populações diferentes, e as diferenças sejam comprovadas através da aplicação de outros marcadores moleculares que não o 16SrDNA, estudos de especificidade de anticorpos, dos hospedeiros, da transmissão e da especificidade do vector (Seemüller & Schneider, 2004).

### **I.1. Fitoplasmas**

#### **I.1.1. Classificação e características**

Inicialmente, todos os seres vivos estavam classificados em 5 reinos (Whittaker, 1969). Com o avançar da tecnologia e dos estudos sobre os seres vivos, Woese propôs uma nova classificação, baseada nos genes ribossomais, composta por três domínios: Bactéria (ou Eubactéria), Archae e Eucarya (Woese *et al.*, 1990). De acordo com este autor, os fitoplasmas são classificados como:

- Reino: Eubactéria
- Filo: Tenericutes
- Classe: Mollicutes



Na classe Mollicute estavam inseridos os MLO, apresentando as seguintes características:

- a) Ausência de parede celular sendo, portanto, organismos resistentes à penicilina e sensíveis à tetraciclina e derivados;
- b) Pleomorfismo (capacidade de assumir várias formas distintas);
- c) Capacidade de trespassar poros até 450 nm de diâmetro;
- d) Genoma de pequeno tamanho;
- e) Parasitas, comensalistas e saprófitas de animais e plantas.

Com base em estudos filogenéticos da sequência do gene ribossomal 16SrDNA (Weisburg, 1989), determinou-se que os Mollicutes estavam relacionados com as bactérias Gram +, contendo uma razão guanina/citosina (G+C) baixa. Ambos se originaram a partir do mesmo organismo ancestral mas, ao longo do seu desenvolvimento, os Mollicutes foram reduzindo sucessivamente o seu genoma e perderam a parede celular.

Estudos indicavam que os genomas de MLO contêm entre 25 e 32% de G+C (Kollar & Seemuler, 1989) e têm entre 640 e 1185 Kb (Neimark *et al.*, 1993, Padovan *et al.*, 2000), valores similares aos dos micoplasmas em estudo.

Comparando as sequências do gene ribossomal 16SrDNA dos MLO pertencentes actualmente ao grupo dos “Aster Yellows” (AY) (Kuske *et al.*, 1992) com outros procariotas, foi demonstrado que os MLO estão aparentados filogeneticamente com os Mollicutes.

O estudo dos fitoplasmas, aplicando técnicas da área da biologia molecular, gerou um grande desenvolvimento no conhecimento dos mesmos, assim como originou uma nova classificação, tendo por base a aplicação de marcadores moleculares, RFLP e sequenciação nucleotídica dos produtos de PCR. O gene 16SrDNA é o mais utilizado na classificação de fitoplasmas, dado que é a região mais conservada do genoma (Schneider *et al.*, 1993).

O gene 16SrDNA codifica o 16SrRNA que é componente da subunidade pequena do ribossoma dos procariotas. O 16SrRNA é constituído por 1500 pb e encontra-se dentro do operão ribossomal dos procariotas, junto a dois outros genes de DNA ribossomal, o 23S de 2900 bases e o 5S de 120 bases, constituindo a subunidade grande. Dentro destes genes encontram-se as regiões intergénicas, que podem conter um ou mais genes de DNA. Os operões ribossomais nos procariotas são transcritos numa só molécula de RNA e, posteriormente, separados por cortes enzimáticos (Condon *et al.*, 1992).

Como mencionado anteriormente, os RNA ribossomais adquiriram uma importância vital no estudo da evolução das bactérias. Concretamente, os genes ribossomais 16S e 23S são utilizados como marcadores moleculares no estudo da filogenia microbiana e sistemática (Guttel *et al.*, 1994).

Actualmente, após amplificação dos segmentos do gene 16SrDNA por PCR e posterior identificação por RFLP, os fitoplasmas foram classificados em vinte grupos (Seemüller *et al.*, 1998) ou em catorze grupos (Lee *et al.*, 1998). No entanto, estes genes não parecem ter variabilidade suficiente para permitir diferenciar isolados que, sendo classificados como o mesmo fitoplasma, diferem na escolha da planta hospedeira ou no insecto vector.

### **I.1.2. Caracterização molecular**

Os fitoplasmas não podem ser cultivados *in vitro* em meios de cultura artificiais. São organismos que, por serem bastante pequenos, perderam a maioria dos processos metabólicos como a síntese de ATP, aminoácidos e ácidos nucleicos (Bai *et al.*, 2006, Oshima *et al.*, 2004) obtendo estes metabolitos dos seus hospedeiros (Hogenhout *et al.*, 2008).

Nos anos 80 foram desenvolvidos anticorpos mono e policlonais, assim como sondas moleculares, tais como fragmentos de DNA de fitoplasma clonado, que foram utilizados para a detecção de vários fitoplasmas em plantas e insectos e para estudar as suas inter-relações genéticas (Lee *et al.*, 2000). Como mencionado previamente, as análises filogenéticas do gene 16SrDNA e sequências do gene da proteína ribossomal colocaram definitivamente os fitoplasmas na classe Mollicutes. Subsequentemente, foram desenvolvidos iniciadores oligonucleótidos universais, baseados em sequências do gene 16SrDNA conservado, com o objectivo de serem utilizados em ensaios de PCR que permitiram, pela primeira vez, a detecção de um grande grupo de fitoplasmas associados a plantas e insectos vectores (Gundersen & Lee, 1996, Schneider *et al.*, 1993).

Foi construído um esquema de classificação com base em padrões de RFLP do gene 16SrDNA amplificado por PCR (Lee *et al.*, 1994). Após muitos anos e estudos, foi possível, finalmente, determinar inequivocamente a identidade de centenas de fitoplasmas. Este processo facilitou bastante os estudos em ecologia e diversidade genómica dos fitoplasmas e a epidemiologia e fisiologia de doenças associadas aos mesmos.

### **I.1.3. Morfologia e estrutura**

A célula dos fitoplasmas está rodeada por uma membrana plasmática trilaminar (substituindo a parede celular) de, aproximadamente, 10 nm de espessura, composta, tal como nos restantes procariotas, por 2/3 de proteínas e 1/3 de lípidos. O seu citoplasma contém ribossomas para a síntese proteica e uma molécula circular de DNA de dupla cadeia. Foi, também, detectada a presença de DNA extracromossómico (Nishigawa *et al.*, 2002).

O seu genoma é bastante pequeno, aproximadamente 750 Kb, com uma elevada concentração de genes (Bai *et al.*, 2006; Gundersen & Lee, 1996; Neimark & Kirkpatrick, 1993; Oshima *et al.*, 2004). Através de estudos serológicos e moleculares observou-se que os fitoplasmas contêm um gene que codifica uma proteína de membrana e esta é única para cada tipo. Estas proteínas são abundantes na superfície externa da célula (Milne *et al.*, 1995) e, através do seu estudo, poder-se-ia explicar a possível interacção fitoplasma-hospedeiro (Morton *et al.*, 2003).

Na sua estrutura, em secções transversais, os fitoplasmas aparentam ser corpos pleiomórficos, redondos, com um diâmetro compreendido entre 200 a 800 µm mas, no entanto, outros estudos revelam uma morfologia filamentosa, apesar da sua forma exacta em plantas doentes ser desconhecida. Estes parasitas endocelulares estão associados a doenças economicamente importantes em centenas de espécies de plantas, o que se reflecte nos seus nomes descritivos e históricos (Križanac *et al.*, 2010).

#### **I.1.4. Multiplicação e transmissão**

Para sobreviverem e se multiplicarem na Natureza, os fitoplasmas necessitam de se reproduzir em diversos hospedeiros: plantas (Reino *Plantae*) e insectos (Reino *Animalia*). Nas plantas, os fitoplasmas são encontrados, principalmente, no floema, quer nos tubos crivosos desprovidos de núcleo quer nas células de floema mais jovens, pois têm capacidade de passar lentamente através dos poros dessas células. Estes organismos foram detectados na maioria dos órgãos de plantas infectadas, tendo sido detectada, também, a presença de DNA do fitoplasma em tecidos embrionários, sugerindo a possível transmissão através de sementes, que ainda não foi demonstrada (Cordova *et al.*, 2003).

Nos insectos picadores-sugadores, os fitoplasmas têm de atravessar as células intestinais, replicar em vários tecidos e alcançar as glândulas salivares para posterior introdução nas plantas, durante o processo de alimentação. Podem ser encontrados intra e extracelularmente nos tecidos sendo, assim, patogéneos/simbiontes de plantas e insectos (Hogenhout *et al.*, 2008). Os fitoplasmas são transmitidos através de insectos pertencentes à ordem Homóptera (Famílias cicadellidae, cixidae, cercopidae, psyllidae e fulgoridae), sendo estes o seu maior factor de dispersão. Mesmo que normalmente não sejam transmitidos à descendência, foi possível demonstrar-se a transmissão vertical do fitoplasma associado à doença FD ("*Flavescence dorée*") no seu vector *Scaphoideus tittanus* Ball (Alma *et al.*, 1997). Podem transmitir-se por um ou vários vectores, dependendo do grau de especificidade. Existem fitoplasmas com baixa especificidade vectorial como por exemplo o AY, que pode ser transmitido por vários insectos. (Toth *et al.*, 1994). Por outro lado, outros fitoplasmas só se transmitem através de um único vector, como é o caso do "*Candidatus*" fitoplasma pyri, para a pereira, só transmitido pela *Cacopsylla pyri* (L.).

Os fitoplasmas podem hibernar no Inverno em vectores infectados, assim como em plantas perenes, que lhes servem de reservatório.

No entanto, os fitoplasmas podem também ser transmitidos através de propagação vegetativa por cortes, armazenamento de tubérculos, rizomas ou bolbos (Lee *et al.*, 2000). Podem, também, ser transmitidos através de enxertia mas não podem ser transmitidos mecanicamente por inoculação de plantas sãs com seiva infectada nem através de pólen (Seidl & Komárková, 1974).

#### **I.1.5. Hospedeiros**

A escolha do hospedeiro para cada fitoplasma depende do comportamento alimentar do vector. Vectores monófagos ou oligófagos disseminam o fitoplasma entre uma ou poucas espécies vegetais, como é o caso da *Cacopsylla pyri* (L.) e o “*Candidatus*” fitoplasma pyri. Por outro lado, se o insecto se alimenta de diferentes espécies vegetais, o fitoplasma poderá afectar um maior grupo de plantas, como é o caso do *Macrostelus fascifrons*, que transmite o fitoplasma AAY (16Srl-A, -B) a mais de 191 espécies de plantas diferentes (Golino *et al.*, 1989).

#### **I.1.6. Interacção fitoplasma-insecto-hospedeiro**

O estudo da interacção fitoplasma-insecto-hospedeiro é determinante para estudos epidemiológicos e definição de medidas de contenção da dispersão das doenças provocadas por fitoplasmas. Os fitoplasmas são transmitidos de maneira persistente, significando que o insecto permanece infectado todo o seu ciclo de vida (Fletcher *et al.*, 1998). O patógeno, adquirido em plantas doentes, entra na cavidade corporal do insecto através do intestino médio e é retido na cutícula. Nesta altura, o fitoplasma já circula dentro do corpo do vector e, usualmente, tem um período de latência no qual não ocorre qualquer transmissão (D'Arcy & Nault, 1982).

Os patógenos podem ficar retidos nos seus vectores durante longos períodos de tempo. Em função da duração deste período, classificam-se:

- Circulativos-não propagativos: têm períodos de latência curtos (poucas horas ou dias);
- Circulativos-propagativos: têm períodos de latência mais prolongados (alguns dias ou semanas).

Um fitoplasma em fase de multiplicação fica retido no seu vector enquanto este não termina o seu ciclo de vida e, por vezes, pode ser passado à descendência através de transmissão transovarial (D'Arcy & Nault, 1982). Esta transmissão não se julgava ser possível para fitoplasmas pois não se pensava ser possível transmitir o fitoplasma directamente da fêmea para a descendência. No entanto, foi descoberta a presença de

“*Candidatus*” fitoplasma prunorum tanto em ovos postos por fêmeas infectadas do vector, *Cacopsylla pruni* Scopoli, em rebentos de ameixeira saudáveis como, consequentemente, em ninfas e novos adultos (Tedeschi *et al.*, 2006).

A relação fitoplasma-insecto pode ser benéfica, prejudicial ou neutra em termos do seu impacto sobre a agilidade do insecto vector (Weintraub & Beanland, 2006). Os primeiros relatos sugeriram que a infecção por fitoplasmas era prejudicial para os insectos vectores do fitoplasma (Severin, 1946). Estudos mais recentes sugerem que os fitoplasmas podem conferir um aumento da boa forma (“fitness”) aos seus vectores.

A infecção por intermédio de fitoplasmas pode ter efeitos distintos em diferentes espécies vectoras. Factores ambientais, como temperatura, também podem mediar os efeitos da infecção fitoplásmica no insecto vector. Os fitoplasmas que reduzem a aptidão dos seus insectos hospedeiros podem ter tido uma curta relação evolutiva com essas espécies de insectos, assim como o processo de selecção poderia ter reduzido os seus efeitos prejudiciais. Apenas os fitoplasmas que não matam os seus vectores sobrevivem ao ser introduzidos numa planta hospedeira e, posteriormente, adquiridos por essa mesma espécie ou outra (Weintraub & Beanland, 2006). A infecção pode, também, tornar a planta num hospedeiro mais adequado ao insecto (por exemplo, reduzindo as defesas químicas naturais).

Pode ser difícil distinguir se o fitoplasma afecta directa ou indirectamente os insectos, alterando a fonte de alimento representada por plantas hospedeiras infectadas (Christensen *et al.*, 2005; Weintraub & Beanland, 2006).

#### **I.1.7. Especificidade fitoplasma-insecto-hospedeiro**

A especificidade da relação fitoplasma-insecto é complexa e variável. Uma única espécie de vector pode transmitir dois ou mais fitoplasmas e um indivíduo pode estar infectado por duas ou múltiplas estirpes de um fitoplasma (Weintraub & Beanland, 2006). As interacções vector-hospedeiro são determinantes na dispersão do fitoplasma. Os sintomas estão correlacionados com o balanço hormonal (Pecho & Vizarova, 1990) e, também, com as alterações de movimentação de hidratos de carbono e aminoácidos nas plantas (Choi *et al.*, 2004). Assim, a infecção pode causar mudanças sistemáticas mas o fitoplasma pode não estar presente em todas as partes da planta que apresentem sintomas. Alternativamente, os balanços bioquímicos causados pela infecção do fitoplasma podem impedir a aquisição deste (Weintraub & Beanland, 2006).

Existem, ainda, hospedeiros “dead-end”. Estes hospedeiros podem ser inoculados e subsequentemente infectados por fitoplasmas mas os insectos vectores não poderão adquirir os fitoplasmas desses hospedeiros (Wei *et al.*, 2004).

### **I.1.8. Dispersão dos vectores**

A dispersão e movimento dos vectores têm um papel fundamental na epidemiologia de doenças associadas a fitoplasmas. É evidente o facto de um insecto não abandonar o hospedeiro principal a não ser que seja forçado a tal, por factores bióticos (por exemplo, estado de desenvolvimento, elevada população de insectos no hospedeiro, tendência genética para a migração) ou abióticos (Weintraub & Beanland, 2006).

De acordo com Power (1992), distâncias mais curtas entre plantas hospedeiras aumentam a probabilidade de um insecto se movimentar entre elas.

Alguns vectores alternam os seus voos entre plantas infestantes e culturas principais. A presença de infestantes na entrelinha poderá ser um factor importante no que respeita à incidência e dispersão do fitoplasma, dado que muitas destas são hospedeiras secundárias de alguns vectores dos mais importantes fitoplasmas.

### **I.1.9. Sintomas em plantas infectadas**

Em geral, as doenças de plantas associadas à presença destes patogéneos reconhecem-se através de um conjunto de sintomas que sugerem profundas alterações nos processos fisiológicos da planta como a fotossíntese, as substâncias de reserva e o equilíbrio hormonal (Chang, 1998).

Esses sintomas incluem virescência (desenvolvimento de flores verdes e perda de pigmentos florais normais), filoidia (encurtamento dos entrenós e proliferação abundante de folhas e de ramos na região apical da planta), esterilidade de flores, proliferação de ramos axilares resultando num aspecto tipo “vassoura de bruxa”, alongamento anormal de entrenós, originando ramos de menor diâmetro, atraso de crescimento geral, originando flores e folhas pequenas e entrenós mais curtos, descoloração de ramos e/ou folhas, enrolamento foliar, crescimento abundante no fim dos raminhos do ano e declínio geral (atrasos de crescimento, ramos secos, amarelamento ou avermelhamento não sazonal das folhas). Os sintomas que ocorrem em plantas doentes variam com o fitoplasma e com o estágio em que se encontra a infecção. Internamente, os fitoplasmas causam necrose excessiva do tecido floémico e, frequentemente, formação excessiva deste, resultando em vasos aumentados. Há plantas que só numa fase avançada da doença mostram sintomas podendo mesmo ser assintomáticas.

O impacto económico dos fitoplasmas pode ir desde a quebra de produção parcial até perda total da cultura (OEPP/CABI, 1996).

### **I.1.10. Medidas de controlo**

Devido à ausência de tratamentos curativos para o controlo de doenças associadas a fitoplasmas, as medidas preventivas apresentam-se como o principal meio de combate e eliminação das mesmas. Estas doenças podem ser evitadas plantando árvores sãs oriundas de material certificado ou variedades tolerantes ou resistentes, sendo sempre importante a aplicação de práticas culturais correctas. O uso de variedades resistentes tem vindo a aumentar com a exploração de resistências naturais em novos programas de melhoramento. Estas variedades foram obtidas pela introdução de genes estranhos (transgenes) (Weintraub & Beanland, 2006) ou pela regulação de genes endógenos, induzindo a produção de compostos defensivos tóxicos para o vector, reduzindo a sua sobrevivência, desenvolvimento e fecundidade (Powell *et al.*, 1995). A alteração da expressão génica das plantas pode, ainda, interferir no crescimento dos fitoplasmas e/ou modificar a resposta do hospedeiro às infecções. Como resultado teríamos um atenuamento dos sintomas (Chen *et al.*, 1994).

Relativamente às pereiras, o maior objectivo do melhoramento genético tem sido a obtenção cultivares resistentes às principais pragas e doenças tais como *Cacopsylla pyri* (L.) e *Erwinia amylovora* (Burrill). As espécies *Pyrus calleryana* Decne e *Pyrus fauriei* (Westwood) podem ser utilizadas como factor de resistência à *Cacopsylla pyri* mas a qualidade dos frutos obtidos é muito baixa. Contrariamente, *Pyrus ussuriensis* Maximowicz é resistente à *Cacopsylla pyri*, apresentando uma qualidade de frutos razoável (Pasqualini *et al.*, 2006).

Os fitoplasmas são microrganismos com baixa tolerância a altas temperaturas (37 °C) de maneira que períodos de incubação a 37-40 °C podem inibir a multiplicação do patógeno na planta, aumentando a probabilidade de sanidade dos ápices dos rebentos desenvolvidos durante o Inverno. Para a eliminação do fitoplasma da flavescência dourada (*Flavescence dorée*) e “Bois Noir” da vinha, a termoterapia tem vindo a ser aplicada com sucesso, onde varas são submersas em água quente (50 °C) durante 45 minutos (Boudon-Padiou *et al.*, 1989). Deve realizar-se este tratamento antes da sua comercialização para eliminação do patógeno e das posturas de inverno do insecto vector, de forma a diminuir a população no ano seguinte (Sousa, 2005).

Em Barcelona foram ensaiados alguns antibióticos para combater os fitoplasmas mas, no entanto, foi desaconselhado o uso destes por serem demasiado tóxicos e perigosos para a saúde pública (Garcia-Chapa *et al.*, 2003).

O tratamento químico apenas poderá ser aplicado aos vectores de modo a controlar a sua dispersão, dado que para o fitoplasma em si não há qualquer produto curativo. A aplicação mostrou-se ineficiente pois o controlo através de insecticidas apenas reduz a

população de vectores na planta, diminuindo, mas não eliminando, a propagação do patógeno (Weintraub, 2007).

Sempre que disponíveis, a introdução e/ou o aumento de fauna auxiliar é, também, importante para o controlo do vector (Weintraub & Beanland, 2006).

## **I.2. Os fitoplasmas em estudo**

### **I.2.1. "Candidatus" fitoplasma pyri, "Candidatus" fitoplasma mali e "Candidatus" fitoplasma prunorum**

Formam o grupo AP ou 16SrX (Lee *et al.*, 1998). O objectivo inicial deste trabalho consistiu no estudo destes três fitoplasmas contudo, a registada escassez de material vegetal e a ausência de insectos nos pomares de pomóideas e prunóideas prospectados obrigou-nos a uma reavaliação da situação. O estudo das doenças AP ("Apple Proliferation") e ESFY ("European Stone Fruit Yellows") e dos seus agentes etiológicos "Candidatus" fitoplasma mali e "Candidatus" fitoplasma prunorum, respectivamente, não foi possível. O estudo incidiu essencialmente no PD ("Pear Decline") e seu agente etiológico "Candidatus" fitoplasma pyri, pelo que este será descrito pormenorizadamente, ao contrário dos restantes, em que apenas serão descritas as características mais relevantes (em I.4.).

Estas três espécies de fitoplasmas partilham entre 98,6% e 99% da sequência do gene 16SrDNA, estando acima do limite, arbitrariamente proposto, de 97,5% para distinção entre espécies de fitoplasmas. No entanto, os fitoplasmas pertencentes a este grupo apresentam, também, diferenças significativas nas suas propriedades biológicas e ecológicas (Nicolíć *et al.*, 2010). Os cromossomas destes três fitoplasmas são lineares, uma característica pouco usual neste tipo de organismos (Križanac *et al.*, 2010).

Estão incluídos na lista A2 da OEPP, que identifica os organismos de quarentena mundiais (OEPP, 2011). Ocorrem em inúmeras regiões produtoras de fruteiras e causam uma forte quebra económica pela diminuição do tamanho e qualidade do fruto, assim como pela diminuição da produção total do pomar.

O "Candidatus" fitoplasma mali é activamente disperso na natureza através de dois insectos psílídeos: *Cacopsylla picta* (Foerster) (sinónimo *Cacopsylla costalis*) e *Cacopsylla melanoneura* (Foerster) afectando, maioritariamente, macieiras (Jarausch *et al.*, 2007).

O "Candidatus" fitoplasma prunorum, transmitido pela *Cacopsylla pruni*, é a doença que causa maiores estragos em pomares de prunóideas (*Prunus* spp.) a nível europeu. As espécies mais afectadas são o pessegueiro e o damasqueiro (Jarausch *et al.*, 2010).

Por sua vez, o PD, cujo agente etiológico é "Candidatus" fitoplasma pyri, tem como vector o único psílídeo descoberto em Portugal até ao momento: *Cacopsylla pyri* (L.)



O fitoplasma causador do declínio da pereira pertence ao grupo 16SrX subgrupo C (Lee *et al.*, 1998). Este grupo engloba diferentes subgrupos, diferenciados pelo padrão obtido após electroforese dos fragmentos de restrição, resultado da digestão enzimática do DNA ribossomal com enzimas de restrição específicas, RFLP. Este fitoplasma tem um genoma de, aproximadamente, 635 Kb (Lauer & Seemüller, 2000) e está presente, maioritariamente, nos tubos crivosos e vasos floémicos (Seemüller *et al.*, 1998).

Estes três fitoplasmas são facilmente distinguíveis entre si, após restrição do fragmento obtido por amplificação por nested-PCR, com os iniciadores específicos para o grupo, f01-r01, com *RsaI* e *SspI*. O ESFY distingue-se do AP e PD por ter um local de restrição adicional na posição 420, quando digerido com *RsaI*. A enzima *SspI* corta o AP na posição 413, um local de clivagem ausente no PD e no ESFY. Para diferenciar o AP e PD do ESFY também se podem utilizar as enzimas *BsaAI* e *Sfcl*. O ESFY apresenta um corte nos 422 pb com a enzima *BsaAI*, ausente no AP (Seemüller & Schneider, 2004).

### I.3. Situação dos pomares de pomóideas e prunóideas em Portugal

Até hoje, não há qualquer estudo ou prospecção destes fitoplasmas nas fruteiras nacionais. As fruteiras, neste caso as pomóideas e prunóideas, são elementos muito importantes na agricultura portuguesa, como é o exemplo da maçã de Alcobaça, da pêra Rocha do Oeste e da cereja do Fundão. Estas três espécies compõem 72% da área nacional de pomares de frutos frescos (Figura 1).

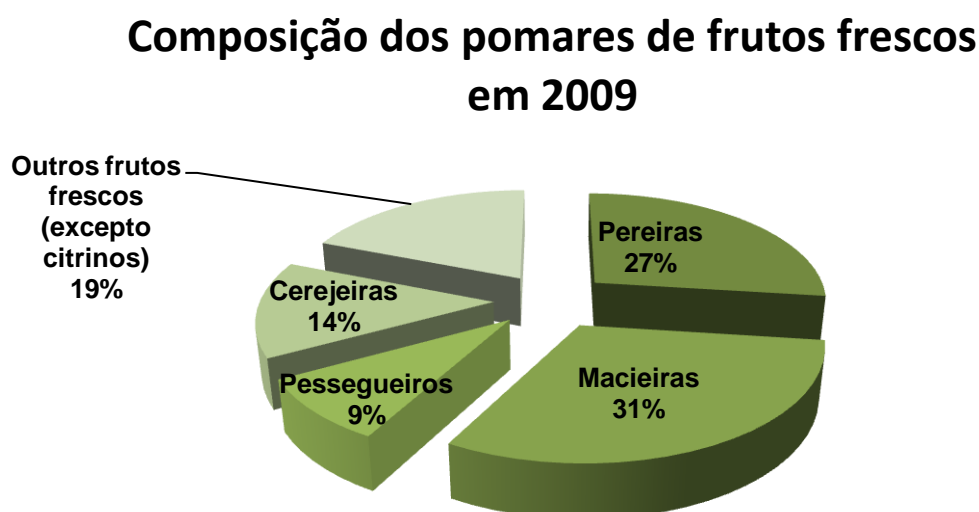


Figura 1: Composição dos pomares de frutos frescos em 2009 (fonte: RGA, 2009/INE, 2011)

Para analisar a área por região de cada espécie fruteira, pode observar-se o quadro 1.

**Quadro 1: Pomares de frutos frescos por região (2009) (fonte: RGA, 2009/INE, 2011)**

Regiões	Macieiras		Pereiras		Pessegueiros		Cerejeiras		Outros	
	Área (ha)	(%)	Área (ha)	(%)	Área (ha)	(%)	Área (ha)	(%)	Área (ha)	(%)
Entre-Douro e Minho	341	3	93	1	78	2	1018	19	124	2
Trás-os-Montes	4645	38	344	3	293	8	1948	36	516	7
Beira Litoral	1256	10	314	3	131	4	65	1	147	2
Beira Interior	1320	11	345	3	1461	39	2191	41	654	8
Ribatejo e Oeste	4275	35	9407	88	1039	28	54	1	1787	23
Alentejo	302	2	190	2	544	15	71	1	1257	16
Algarve	11	0	22	0	151	4	5	0	3137	40

Os pomares de frutos frescos distribuem-se por 41,5 mil explorações e ocupam uma superfície cerca de 40 mil hectares, dos quais 41% no Ribatejo e Oeste, 19% em Trás-os-Montes e 15% na Beira Interior. A área de macieira, que representa quase 1/3 do total dos frutos frescos, localiza-se maioritariamente em Trás-os-Montes (38%) e no Ribatejo e Oeste (35%), sendo que é também nesta última região que se concentra 88% da superfície dos pomares de pereiras. A Beira Interior é a região onde se localizam as maiores áreas de pessegueiros (39%) e cerejeiras (41%).

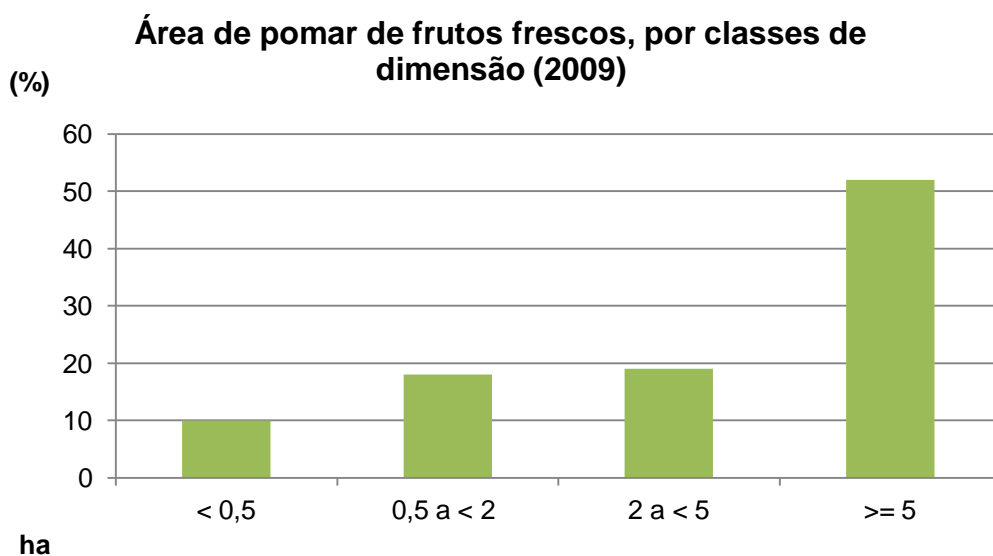
Em termos regionais, o Ribatejo e Oeste continua a ser a principal região produtora de frutos frescos, isto apesar da sua área ter recuado mais de 8 mil hectares na última década (RGA, 2009). O elevado grau de profissionalismo do sector da produção da pêra, bem como o dinamismo das associações ligadas a esta fileira (especialmente na componente da comercialização), permitiu manter esta espécie como o principal fruto fresco produzido na região do Ribatejo e Oeste, ainda que se tenha assistido a uma redução de 8% na superfície e de 46% nas explorações (com a dimensão média dos pomares de pêra nesta região a aumentar dos 1,2 hectares em 1999 para os 2 hectares em 2009) (RGA, 2009).

A dimensão média nacional dos pomares de frutos frescos aumentou dos 0,74 hectares em 1999 para 1,1 hectares em 2009 (RGA, 2009) (Quadro 2).

**Quadro 2: Dimensão média dos pomares de frutos frescos (1999-2009) (fonte: RGA, 2009/INE, 2011)**

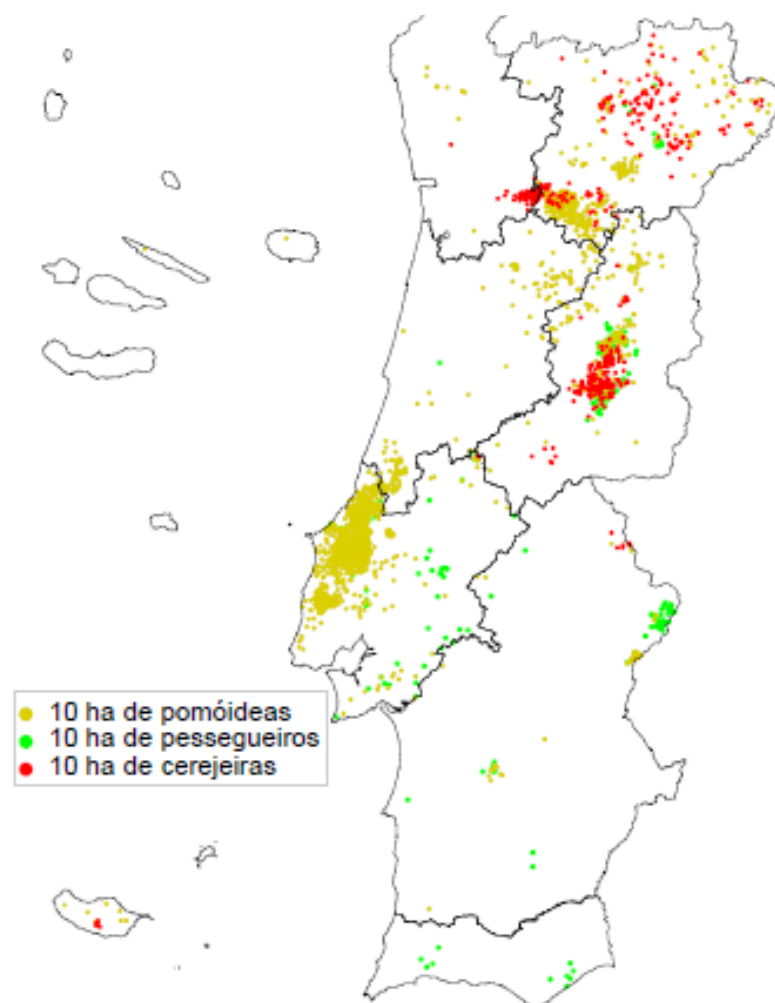
Regiões	Dimensão média (ha)	
	1999	2009
Entre-Douro e Minho	0,4	0,5
Trás-os-Montes	0,6	0,8
Beira Litoral	0,5	0,4
Beira Interior	1,0	1,1
Ribatejo e Oeste	1,5	2,1
Alentejo	0,8	2,2
Algarve	0,4	0,5
Média total	0,74	1,1

Como se pode observar na figura 2, o número de explorações com área de frutos frescos superior a 5 hectares representa 52%. Com percentagens inferiores, encontram-se a classe de 2 a < 5 hectares que representa 19%, a classe de 0,5 a < 2 hectares com 18% e a classe que corresponde a pomares com área inferior a 0,5 hectares que representa 10% do total.



**Figura 2: Área de pomar de frutos frescos, por classes de dimensão em 2009 (fonte: RGA, 2009/INE, 2011)**

Na figura 3 conseguem-se observar as regiões mais representativas de cada espécie de fruteira. Na zona do Ribatejo e Oeste predominam as pomóideas, macieiras e pereiras e na zona da Beira Interior e Trás-os-Montes predominam as cerejeiras. Os pessegueiros, apesar de mais dispersos, apresentam maior destaque na zona da Beira Interior.



**Figura 3: Superfície de pomóideas, pessegueiros e cerejeiras**

Por serem culturas que contribuem bastante para a economia nacional, é imperativo que se controle ao máximo as doenças e pragas que possam vir a prejudicar a qualidade do fruto produzido, assim como a quantidade obtida após colheita. O facto de não terem sido encontrados, até ao momento, os vectores de dois dos fitoplasmas, AP e ESFY, não significa que estes, assim como os fitoplasmas que transmitem, estejam ausentes. Há a possibilidade de introdução destes patogéneos através de material de propagação vegetativa, como descrito anteriormente. Há, também, que ter em conta o facto de as doenças associadas a fitoplasmas serem, por vezes, assintomáticas, pelo que podem passar despercebidas.

## I.4. “Pear Decline”

### I.4.1. Dispersão

A primeira informação acerca da existência desta doença ocorreu no ano 1934, em Itália, e era conhecida como “moria” das pereiras (Carraro *et al.*, 2001). Na década de 40, foi citada nos Estados Unidos da América e Canadá por McLarty (1948) mas só em 1963 é que a etiologia da doença foi considerada a mesma em ambas as zonas (Carraro *et al.*, 2001).

O impacto desta doença nos pomares de pereira foi e continua a ser bastante importante. Na Califórnia, entre 1959 e 1962, morreram cerca de 1 milhão de árvores (Batiste & Bulla, 1980). No início dos anos 70, em Itália, morreram cerca de 50 mil e na Alemanha registaram-se 27,8% de mortes em pomares de 8 anos. Como se pode observar na figura 4, dispersão mundial da doença, o continente Africano começa a registar os primeiros focos da doença. A primeira referência na Tunísia foi reportada em 1994, em árvores provenientes de Espanha. A Tunísia detém 11% da produção de pêra de todo o continente Africano (Khalifa *et al.*, 2007). O continente Americano, sendo o ponto de partida da doença, ainda apresenta alguns focos da mesma. A Oceânia também apresenta pomares infectados.

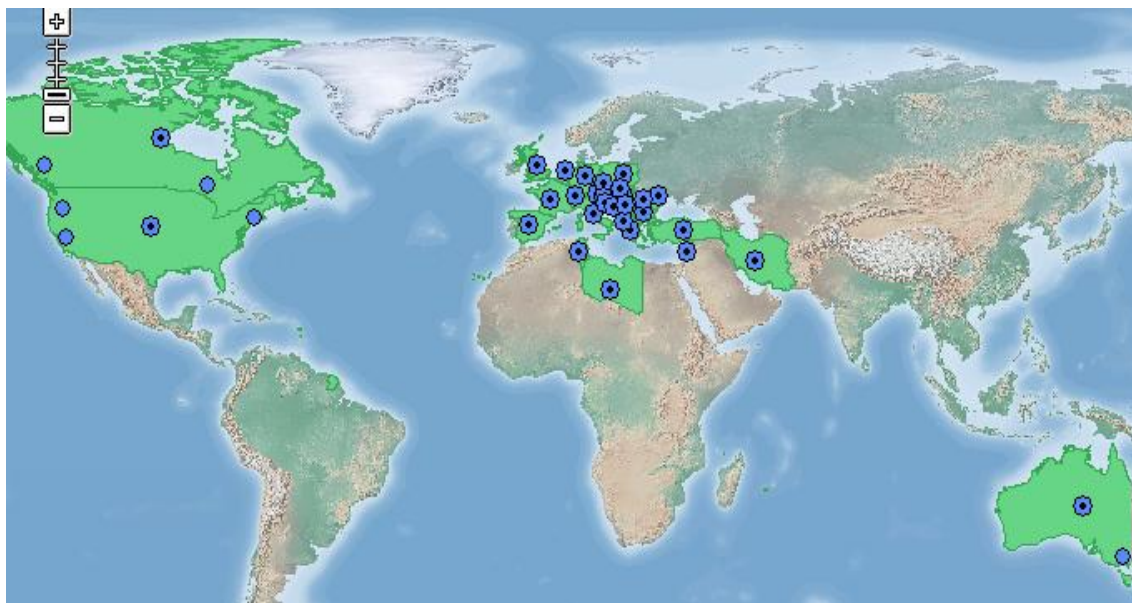


Figura 4: Dispersão mundial do “Pear Decline” (fonte: <http://www.plantwise.org/>)

A doença foi chegando, progressivamente, entre os anos 70, 80 e 90, a quase todos os países da Europa: Áustria, Bélgica, antiga Checoslováquia, Croácia, Inglaterra, Roménia, França, Grécia, Suíça e antiga URSS (OEPP/CABI, 1996), como se observa na figura 5. Na Hungria, os primeiros relatórios sobre a incidência da doença foram criados no fim dos anos

Em Espanha, pensa-se que o PD existe desde os anos 60 pelo estudo de árvores com sintomas, apesar do patogénico em si não ter sido estudado (Avinent *et al.*, 1997). Por ser o país mais próximo de Portugal, é importante o controlo das importações.



Em Portugal, apesar de se conhecer a existência do vector, nunca antes foram realizados estudos para prospecção do fitoplasma nem sobre o fitoplasma em si.

Os principais hospedeiros deste fitoplasma são as pereiras (*Pyrus* spp.). Pereiras enxertadas em *P. pyrifolia* e *P. ussuriensis* (especialmente garfos de “Williams”, “Beurré Hardy” e “Max Red Bartlett”) são propícias ao declínio rápido. Porta-enxertos tolerantes, tais como, *P. communis*, *P. betulifolia* e *P. calleryana* são mais propícios ao enrolamento foliar (declínio lento). A doença também foi observada em marmeleiro e, ocasionalmente, em árvores enxertadas nesta espécie. É frequentemente encontrado em *Catharanthus roseus* ou Vinca, uma planta muito utilizada em testes de comportamento e transmissão de fitoplasmas.

15



### **I.4.3. Sintomas**

Dependendo da virulência e/ou sensibilidade do porta-enxerto, as manifestações da doença por parte da pereira podem classificar-se como declínio lento ou declínio rápido.

#### **a) Declínio lento**

A doença desenvolve-se lentamente e as árvores podem sobreviver durante anos.

Os sintomas mais fáceis de identificar ocorrem no fim do Verão, onde se verifica o desenvolvimento de coloração foliar outonal precoce. A maioria das cultivares de pereira desenvolve uma coloração avermelhada, como se poderá observar nas figuras 6 e 7, podendo, também, observar-se o enrolamento e queda prematura das folhas. Este sintoma deve ser interpretado com algum cuidado pois pode também estar associado causas mais comuns, como por exemplo: alagamento, danos nas raízes, cancro bacterianos e incompatibilidade de garfo/porta-enxerto.



**Figura 6: Descoloração precoce da folhagem**  
(fonte: OEPP)



**Figura 7: Avermelhamento da folhagem**

Na Primavera seguinte, as árvores afectadas podem apresentar um fraco crescimento e folhagem pálida e dispersa. A severidade dos sintomas Primaverares pode variar desde a ausência à morte.

A floração pode ser abundante mas, frequentemente, de fraca evolução. Os botões florais tornam-se acastanhados e morrem, apesar de permanecerem na árvore. As flores acabam por cair e a produção de frutos diminui bastante. A madeira do tronco, assim como

os rebentos, tornam-se alaranjados, sendo mais evidente nos raminhos do ano. Pode existir uma linha de tecido necrótico no câmbio, junto à união entre o garfo e o porta-enxerto.

Os sintomas podem alterar-se segundo as condições climáticas, edáficas e biológicas em que se encontra a árvore. Se, por exemplo, uma árvore sofre ataques continuados do vector, pode passar a ter um declínio rápido.

#### b) Declínio rápido

Foi observado, principalmente, em pomares de pereira europeus enxertados sobre garfos orientais (*P. calleriana*, *P. pyrifolia*, *P. serotina* e *P. ussuriensis*). Caracterizam-se pelo amarelecimento e morte das árvores em poucas semanas ou mesmo dias. As folhas e os frutos murcham rapidamente. As gemas e flores abrem-se e caem. Tudo isto deve-se a um colapso dos tecidos vasculares devido à súbita obturação dos tubos crivosos pelo fitoplasma. A infecção, conjuntamente com a descontinuidade vascular no local de enxertia, provocam um efeito sinérgico que leva a uma rápida evolução da doença. Este processo ocorre no final do Verão, mesmo antes da colheita dos frutos e em pomares jovens (3, 4 anos). Na figura 8, pode observar-se o aspecto duma árvore em declínio rápido (OEPP/CABI, 1996).



**Figura 8: Declínio rápido da pereira**



#### **I.4.4. Distribuição do fitoplasma na árvore**

Os fitoplasmas patogêneos de plantas lenhosas e de folha caduca, geralmente, seguem um ciclo ao longo de todo o ano. É conhecido que a persistência do fitoplasma nas partes aéreas da árvore depende da fase evolutiva do floema (Braun & Sinclair, 1976). A enxertia de garfo ou borbolha conduz à transmissão da doença durante o Verão ou Outono, quando a formação de tubos crivosos atinge a máxima concentração (Schneider, 1970) mas não no Inverno, devido à degeneração dos mesmos. No entanto, o entrelaçamento de raízes entre árvores sãs e infectadas pode resultar em transmissão do fitoplasma no Inverno, pelo que se pode afirmar que estes hibernam nas raízes (Garcia-Chapa *et al.*, 2003).

Há, também, trabalhos que sugerem que o fitoplasma permanece na parte aérea durante a dormência invernal (Jarausch *et al.*, 1999). Nas zonas mediterrânicas, este fitoplasma pode ser detectado nos ramos, durante todo o ano, sendo a sua concentração bastante irregular (Garcia-Chapa *et al.*, 2003).

#### **I.4.5. Transmissão**

O principal meio de transmissão do fitoplasma é o seu vector, *Cacopsylla pyri* (L.), seguido da técnica de enxertia, onde ou garfo ou porta-enxerto poderão estar infectados, dispersando a doença pela árvore.

A poda, os cortes ou o contacto com objectos cortantes utilizados em árvores infectadas não aparenta ser um risco à propagação da doença. Novamente se afirma que o fitoplasma é intransmissível através de pólen ou sementes.

#### **I.4.6. O vector**

Os vectores de fitoplasmas, na sua maioria psílídeos pertencem à ordem Homóptera, subordem Sternorrhyncha e género *Cacopsylla*. A subordem Sternorrhyncha é considerada a base da ordem Homóptera e está relacionada com a posição da armadura bucal em relação ao corpo.

##### **I.4.6.1. Evolução**

Fósseis de psílídeos foram descobertos no início da era Pérmica, antes da evolução das angiospérmicas, o que leva a concluir que, anteriormente, os psílídeos se alimentavam de gimnospérmicas. O aumento exponencial de angiospérmicas no Cretáceo foi paralelo ao crescimento exponencial dos insectos a elas associados e, muitos dos caracteres morfológicos e metabólicos que as angiospérmicas exibem, podem ter evoluído de defesas contra insectos herbívoros. Primitivamente, os insectos seriam maioritariamente saprófitas com uma mudança para hábitos herbívoros, uma adaptação secundária (Mitter *et al.*, 1988).

A alocação de recursos nas plantas varia sazonalmente, dentro de cada planta, entre plantas e de espécie para espécie (Greinwald *et al.*, 1992).

#### **I.4.6.2. Morfologia e Biologia**

Os psílídeos são pequenos insectos fitófagos, que se alimentam de floema e tipicamente monófagos (alimentam-se de uma só planta) ou oligófagos (alimentam-se de algumas plantas relacionadas).

De todos os Homóptera, os psílídeos são, provavelmente, os mais benignos e, assim, os menos estudados.

São insectos hemimetabólicos ou seja, as suas metamorfoses são incompletas, passando pelos estádios de ovo, ninfa e adulto.

O ovo de *Cacopsylla pyri* (L.) mede, em média, 320 µm de comprimento e 150 µm de largura. O ovo é fixado aos tecidos vegetais por um pedúnculo. É amarelo claro e a seguir à eclosão amarelo-alaranjado. Os ovos são depositados isoladamente ou em pequenos grupos, sobretudo nas rugas da casca, na base dos gomos e esporões da madeira do ano precedente. A partir da abertura dos gomos as fêmeas depositam os seus ovos sobre os órgãos verdes: pedúnculos florais, limbo e pecíolo das folhas. Pouco antes da eclosão, os olhos da larva são visíveis sob a forma de dois pontos vermelhos.

A psila-da-pereira passa por cinco instares ninfais.

As ninfas, de início globosas e amarelas, tornam-se achatadas de coloração acastanhada com manchas mais escuras. Medem consoante a sua evolução de 0,4 mm a 1,7 mm (Almeida, 1982).

Os adultos são semelhantes a pequenas cigarras, devido à posição, quando em repouso, dos dois pares de asas membranosas colocadas quase verticalmente ao longo do corpo. Medem de 2,2 mm a 2,9 mm de comprimento e são insectos saltadores, sendo os principais causadores de galhas. Outro dos aspectos mais característicos destes insectos é a venação das asas que permite, muitas das vezes, a distinção entre espécies.

A *Cacopsylla pyri* (L.) apresenta duas formas adultas: uma invernal escura e uma estival castanha-clara. A invernal hiberna nos pomares de pereira e põe ovos nos rebentos da pereira antes ou durante o abrolhamento. Estes ovos dão origem à psila estival, apresentando 3 a 5 gerações durante o período vegetativo. Estudos recentes provam que o “*Candidatus*” fitoplasma *pyri* consegue hibernar no corpo da psila (Carraro *et al.*, 2001), permitindo que a doença se disperse durante o período vegetativo seguinte (Süle *et al.*, 2007).

Hiberna no estado adulto, escondida em sítios capazes de lhe assegurar protecção: nas fissuras da casca ou intersecção dos ramos, debaixo das pedras ou torrões de terra e noutros abrigos do pomar. Pode encontrar-se, também, sobre outras árvores na proximidade

dos pomares. A actividade dos adultos hibernantes é muito reduzida enquanto a temperatura é baixa, no entanto, e desde que esta se eleve acima dos 5 °C começam a deslocar-se, podendo ser observados nas horas mais quentes do dia a alimentarem-se através das picadas que fazem nas vergôntas. Esta temperatura só lhes permite uma actividade parcial. Contudo, desde que se atinjam os 10 °C durante dois a três dias, as fêmeas começam as suas posturas. O seu início varia de ano para ano e de região para região, podendo generalizar-se de meados de Janeiro a meados de Fevereiro. No Ribatejo e Oeste é mais comum que as fêmeas iniciem as suas posturas a partir de meados de Fevereiro (SYNGENTA, 2011).

A fecundidade das fêmeas hibernantes é em média de 150 a 200 ovos podendo atingir, nas gerações estivais, 500 a 600 ovos. A duração de incubação é variável com as condições climáticas.

O aparecimento das ninfas de primeira geração coincide com a explosão dos botões florais, colonizando as inflorescências e os frutos jovens. Como têm pouco alimento, esta geração tem tendência a morrer. Nas gerações seguintes, as posturas são geralmente efectuadas sobre as folhas ou na parte terminal dos lançamentos (Almeida, 1982).

#### **I.4.6.3. Danos causados**

Na Europa, todas as cultivares comerciais de pereira são fortemente susceptíveis à *Cacopsylla pyri* (L.). As ninfas têm a capacidade de excretar uma melada que, em períodos quentes, provoca queimaduras graves no fruto e age como meio de crescimento de fumagina, um fungo que vai criar uma camada negra na epiderme do fruto e nas folhas, diminuindo o poder fotossintético destas (Almeida, 1982). Quando presente nos frutos, diminui o seu valor comercial (SYNGENTA, 2011). Adicionalmente, e como já referido anteriormente, o maior risco das psilas da pereira é o facto de poderem transmitir um fitoplasma à árvore – “*Candidatus*” fitoplasma pyri.

#### **I.4.6.4. Medidas de profilaxia**

A protecção das pereiras contra a psila deve ser primordialmente preventiva, evitando o excesso de vigor utilizando uma poda correcta e, não menos importante, preservar ou introduzir auxiliares, tais como as larvas de Sirfídeos, de Crisopídeos e de Antocorídeos.

A avaliação dos riscos compreende três fases:

- Período invernal: observação visual de 100 ramos aleatoriamente (Fêmeas hibernantes) ou através da técnica das pancadas de forma a observar e avaliar os adultos presentes no pomar e verificar os níveis económicos de ataque;

- Fevereiro a Abril: observação visual de 100 inflorescências e verificação dos níveis económicos de ataque para este período;
- Abril até final do ciclo: acompanhar as fases da praga nos novos rebentos através da técnica das pancadas e verificar os níveis económicos de ataque para esta fase, de forma calendarizar mais correctamente os tratamentos a efectuar.

Estes insectos facilmente se tornam resistentes aos insecticidas, havendo poucas substâncias activas próprias para o seu controlo. Segundo a base de dados de Resistência aos pesticidas dos Artrópodes (“Michigan State University”), a *Cacopsylla pyri* (L.) apresenta resistência aos seguintes: fosforados, piretróides e amitraze (Dow Agrosiences).

#### **I.4.6.5. Nível económico de ataque**

- De Dezembro a Fevereiro: 5% dos ramos com adultos;
- De Fevereiro a Abril: 10% das inflorescências com ovos;
- Da plena floração a Outubro: 15 a 30% de rebentos ocupados com ninfas; 30 adultos em 30 pancadas (SYNGENTA, 2011).

#### **I.4.7. Diagnóstico**

A distribuição aleatória dos fitoplasmas ao longo do floema da planta infectada e a sua baixa concentração, especialmente em plantas lenhosas, assim como as variações da acumulação do fitoplasma, de acordo com a estação do ano e órgão da planta (Firrao *et al.*, 2004) são obstáculos importantes para um diagnóstico eficiente.

Para se proceder à diagnose de qualquer doença causada por um patógeno é necessário conhecer as características fundamentais que permitam a sua identificação, assim como a natureza desse patógeno (bactéria, fungo, vírus, fitoplasma). O processo de diagnóstico engloba variadíssimas fases.

É essencial que se efectue todo o processo de diagnose com a máxima perícia pois qualquer deslize levar-nos-á a erros, o que poderá ser prejudicial a todas as partes envolvidas: agricultor, técnicos e engenheiros.

##### **I.4.7.1. Extracção do ácido nucleico total (ANt)**

O isolamento do ácido nucleico é a primeira etapa para a detecção e identificação de fitoplasmas, por PCR, em plantas e insectos. É um processo que requer minuciosidade e atenção pois qualquer contaminação é irremediável. As preparações de DNA devem dar origem a extractos suficientemente puros para não inibir a acção da enzima DNA polimerase e, consequentemente, não interferir na eficiência de amplificação por PCR, assim como não causar interferência nos padrões de restrição.

Uma das limitações dos métodos de extração total do ácido nucleico, normalmente utilizados, remete ao facto de se extrair o DNA, em conjunto com o RNA, da planta ou insecto, conjuntamente com os do fitoplasma, caso haja infecção. Como o DNA do fitoplasma apresenta, geralmente, baixas concentrações comparativamente ao da planta ou insecto, estão a ser desenvolvidos métodos que permitem separar o DNA do fitoplasma do DNA do hospedeiro, enriquecendo, assim, os extractos obtidos (Garcia-Chapa *et al.*, 2004). No entanto, devido às limitações do período análise-resposta, estes métodos raramente são aplicados.

O que diferencia os métodos de extração em qualidade e pureza do ácido nucleico são os tampões de extração utilizados. O método de extração mais utilizado, hoje em dia, é o método CTAB ("Cetyl trimethylammonium bromide"), podendo variar na sua concentração. Há outros métodos de extração que se conhecem eficientes, que é o caso do método PGB ("Phosphate Grind Buffer"). Este método é tido como moroso mas, no entanto, origina um extracto de ácido nucleico mais puro, com menor quantidade de contaminantes.

Um outro problema da extração do ácido nucleico total das plantas e insectos é o facto de estes terem uma parede celular rígida, o que dificulta a sua lise. Para tal, ao CTAB, um detergente, é adicionado EDTA ("Ethylenediaminetetracetic acid"), substância quelante, formando complexos muito estáveis com o  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ , para  $pH > 7$ , que inibe a acção de DNases, assim como permite remover os iões magnésio que estruturam a parede celular (Sambrook *et al.*, 1989).

Após a lise, deve evitar-se a oxidação do ácido nucleico, catalisada pela existência de compostos fenólicos nas células. Para evitar os efeitos oxidativos dos compostos fenólicos é utilizado um agente anti-oxidante,  $\beta$ -mercaptoetanol, activado por acção do calor, aplicado a cada amostra a ser extraída.

Outros constituintes celulares que se devem eliminar ao máximo da solução extraída são as proteínas. As proteínas são consideradas contaminantes e podem inibir as reacções de PCR. Para a sua remoção utiliza-se clorofórmio. Este separa os ácidos nucleicos do CTAB e dos complexos polissacáridos/proteínas, desnaturando-as e tornando-as insolúveis na fase aquosa.

Quanto mais puro o ácido nucleico, mais fiáveis serão os resultados pois não há interferência de inibidores que podem, no extremo, inibir a amplificação do DNA e, assim, originar falsos negativos.

#### I.4.7.2. PCR ( “Polymerase Chain Reaction”)

Apesar da sua elevada sensibilidade, o diagnóstico por PCR pode ser pouco viável tendo em conta a distribuição do fitoplasma na árvore e nos tecidos amostrados e, consequentemente, a baixa concentração do seu DNA nos extractos. Também a ter em conta a presença de inibidores que poderá variar ao longo do ano e, assim, afectar a pureza dos extractos (Garcia-Chapa *et al.*, 2003). A detecção por PCR convencional tem por base o uso de iniciadores gerais do 16SrDNA ou então específicos para o grupo a testar, sendo necessário, em muitos casos, um nested-PCR de duas reacções. No entanto, a preparação e realização duma nova reacção aumenta fortemente o risco de contaminações devido à manipulação do produto amplificado na reacção anterior (Torres *et al.*, 2005).

Esta técnica consiste em sucessivas replicações *in vitro* de DNA, desenvolvida em 1983 por Kary Mullis, que viria a receber o Nobel da Química em 1993. Com esta técnica, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida de vários tipos de patologias, entre outras coisas. O PCR é uma técnica muito mais sensível, comparando com testes serológicos. O desenvolvimento desta técnica permitiu que fosse possível identificar e classificar um grande número de fitoplasmas (Christensen *et al.*, 2004).

O processo PCR decorre em três passos que, em conjunto, se designam como ciclo e que será repetido *n* vezes:

1. Desnaturação: Ocorre a temperatura elevada, geralmente superior a 90 °C e separa a cadeia dupla de DNA, quebrando as pontes de hidrogénio que ligam as bases, permanecendo as ligações entre o fosfato e a desoxirribose intactas.
2. Hibridação: Os iniciadores, curtas sequências de nucleótidos entre 20 a 30 bases, marcam as extremidades da sequência alvo. Um dos iniciadores liga-se à extremidade 5' de uma cadeia simples obtida no passo 1, enquanto que o outro se liga à extremidade 3' da outra cadeia. A temperatura de hibridação normalmente encontra-se entre 40 °C e 65 °C, dependendo do número de bases dos iniciadores e da sua sequência. A escolha criteriosa desta temperatura permite que estas sequências iniciadoras se liguem à sequência alvo com elevada especificidade.
3. Extensão: Após a ligação dos iniciadores às sequências complementares de DNA, a temperatura eleva-se a aproximadamente 72 °C e a enzima *Taq* DNA polimerase replica a cadeia de DNA. A *Taq* DNA polimerase é uma polimerase de DNA termo-estável recombinante do organismo *Thermophilus aquaticus*, que, ao contrário de outras polimerases, se mantém activa a temperaturas elevadas. O processo de síntese é iniciado numa zona com cadeia dupla (onde estão ligados

os iniciadores), incorporando os nucleótidos complementares à sequência alvo e utilizando os dNTP em solução. A extensão inicia-se sempre no extremo 3' do iniciador, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples. A *Taq* DNA polimerase sintetiza exclusivamente na direcção 5' para 3'.

No final do primeiro ciclo da PCR, encontramos duas novas cadeias de DNA idênticas à original. No final de toda a amplificação temos 2<sup>n</sup> novas cadeias de DNA.

#### I.4.7.2.1. Nested-PCR

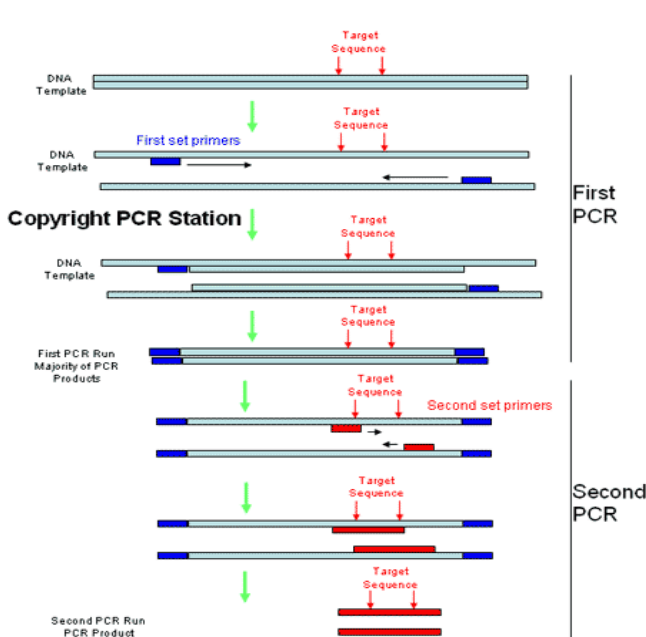
O nested-PCR é uma variante do PCR, em que dois pares de iniciadores (em vez de um) são utilizados na amplificação de um fragmento.

O primeiro par de iniciadores amplifica um fragmento similar a um PCR normal. No entanto, um segundo par complementa a sequência interna do primeiro fragmento obtido, permitindo a amplificação de um segundo produto PCR, mais pequeno que o primeiro.

O nested-PCR é uma amplificação por PCR muito específica pelo que, se na primeira reacção for aplicado um fragmento errado, a probabilidade de que esse fragmento amplifique a segunda vez é muito baixa.

O problema deste método reside no facto de se aumentar a probabilidade de contaminações pois terá que se dar o processo de transferência do produto previamente amplificado para a nova amplificação.

Através da figura 9, poder-se-á compreender melhor todo o processo de nested-PCR, aplicado, como exemplo, à detecção dos fitoplasmas do grupo AP.



**Figura 9: Esquemática do método nested-PCR**

Este processo comporta 2 passos:

Primeiro: o DNA alvo é ligado pelo primeiro par de iniciadores, universal P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995), mostrado na figura a azul, dando-se a reacção normal, descrita em I.4.7.2.

Segundo: O produto de amplificação obtido do primeiro passo é sujeito a uma nova amplificação mas com novo par de iniciadores mais internos, par específico para o grupo AP, f01-r01 (Lorenz *et al.*, 1995), mostrado, na figura 9, a vermelho. Estes iniciadores vão amplificar um fragmento mais pequeno, mais interno,

aumentando a especificidade do produto PCR amplificado.

(<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/> ; <http://www.pcrstation.com/nested-pcr/>)

#### **I.4.7.3. Electroforese**

Após realização do nested-PCR, é necessária a realização de uma electroforese para que seja possível obter uma prova visual dos resultados. É neste processo que se verifica se a amostra é positiva ou negativa para o fitoplasma em estudo pois, se for positiva, apresentará uma banda de peso molecular equivalente ao comprimento do fragmento genómico (número de bases) delimitado pelo par de iniciadores específicos do fitoplasma a detectar.

A molécula de DNA possui carga negativa, apresentando um pH neutro ou alcalino e, consequentemente, quando aplicada num gel, submerso numa solução tampão de pH definido (por exemplo, TAE pH 8,3) e submetido a um campo eléctrico, migra em direcção ao pólo positivo (cátodo). Os tampões normalmente utilizados são o TAE e o TBE.

O gel utilizado é, normalmente, de agarose, cuja concentração varia de acordo com o número de nucleotídeos dos produtos PCR. Para que se possam observar as bandas, é necessária a incorporação no gel de uma substância fluorescente, tal como o brometo de etídio, que se intercala entre as bases de DNA, permitindo a visualização das bandas à luz ultravioleta.

#### **I.4.7.4. Real-time PCR**

O Real-time PCR vem substituindo, recentemente, o PCR convencional com o objectivo de aumentar a velocidade e a sensibilidade da detecção e melhorar as técnicas para monitorização em massa. Os métodos baseados em real-time PCR oferecem uma detecção quantitativa, específica e sensível. Durante uma corrida por real-time PCR, a acumulação de amplicões é monitorizada ciclo a ciclo através da medição de fluorescência não sendo necessário manipular o produto do PCR pós reacção como para realização de uma electroforese que é um passo obrigatório no fim de uma corrida de PCR convencional. A quantidade de fluorescência, monitorizada a cada ciclo de amplificação, é proporcional ao logaritmo da concentração do alvo PCR e, por esta razão, o Real-time PCR é uma poderosa técnica para quantificar DNA específico.

As sondas TaqMan® são as mais utilizadas para diagnóstico de fitoplasmas apesar de algumas outras ferramentas de detecção de sequências específicas estarem disponíveis (Monis & Giglio, 2006) em que, na teoria, poderão ser adaptadas à detecção destes patogéneos. As sondas TaqMan® são marcadas na extremidade 5' com um "reporter" e na extremidade 3' com um "quencher". O equipamento utiliza uma fonte de luz capaz de excitar o fluorocromo "reporter". A fluorescência é produzida pela amostra somente quando há amplificação como resultado directo da acção da polimerase de DNA. Esta, para sintetizar a nova cadeia de DNA precisa de desalojar a sonda hibridada com a cadeia molde, numa posição intercalar aos dois iniciadores. A remoção da sonda é feita nucleótido a nucleótido



pelo que no final, o nucleótido marcado com o “repórter” se vai encontrar em solução e afastado do que está marcado com o “quencher”. A acção do “quencher deixa de se fazer sentir e a fluorescência emitida pelo “repórter” é detectada pelo sistema. O momento da reacção de PCR em que a fluorescência de determinada amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (“*background*”) é comumente denominado de Ct (“threshold cycle”). A linha de “threshold” é uma linha que, teoricamente, deve passar nos pontos de inflexão de todas as curvas de amplificação quando em escala linear ou alternativamente, na fase linear quando em escala logarítmica (Galetto & Marzachi, 2010).

#### **I.4.7.5. Sequenciação nucleotídica**

Consiste na determinação precisa da sequência de nucleotídeos numa amostra de DNA.

Este processo é feito externamente à maioria dos laboratórios, sendo posteriormente enviada a sequência por via electrónica, onde poderá ser estudada em programas apropriados, acessíveis na internet, como o BLASTn (NCBI). Este programa é utilizado na pesquisa de sequências de nucleotídeos similares. É um motor de busca que, perante uma sequência introduzida, disponibiliza uma lista de sequências semelhantes, posteriormente estudadas, que apresentem homologia com a introduzida pelo utilizador.

#### **I.4.7.6. RFLP**

Esta técnica baseia-se no facto de as sequências genéticas poderem ser cortadas especificamente, por determinadas enzimas, em locais designados como “sítios de restrição”, que são sequências de DNA reconhecidas pelas endonucleases de restrição; estas sequências de alguns pares de bases são simétricas e constituem as “palíndromes”. Esta técnica permite colocar em evidência os polimorfismos presentes nos fragmentos amplificados. A diferença de um só par de bases pode ser visualizada em gel de poliacrilamida ou de várias bases em gel de agarose, o que permite agrupar as estirpes em presença ou ausência de sítios polimórficos (Wiedbrawk & Farks, 1999).

## **II. Objectivos**

Este trabalho teve como objectivos a pesquisa de fitoplasmas em pomóideas e prunóideas testando, através de técnicas biomoleculares, os seus vectores capturados em pomares e material vegetal colhido de árvores desses mesmos pomares, localizados na região Oeste, zona de maior produção de pomóideas em Portugal.

### III. Material e Métodos

Foram colhidas amostras de material vegetal e de psilas para posterior identificação e análise.

#### III.1. Material

##### III.1.1. Material Vegetal

O material vegetal em estudo teve origem nos locais indicados no quadro 3.

Quadro 3: Origem, variedade e data de colheita das amostras de material vegetal analisadas

Região de origem	Localidade	Espécie	Variedade	Data de colheita
Oeste	Alcobaça	Pereira	Rocha	Junho de 2011
			Porta-enxerto CMA	
			Porta-enxerto OHF333	
			Carapinheira	
		Ameixeira	Black Diamond	
		Cerejeira	?	
			Porta-enxerto Colt	
	Sobrena Alguber	Pessegueiro	Rich Lady	Julho de 2011
		Damasqueiro	?	
INRB L-INIA (ex-ENFVN)	Alcobaça	Macieira	Rocha	Dezembro de 2009
			Malápio da Serra	
			Pipo de Basto	
			Bravo cl. 241	
			Parto Lindo	
			Tromba de Boi	
			Pêro Rei de Carrazêda	
			Piparote	
			Pêro de Coura	
			Malápio de Ponte	
			Bravo cl. 257	
			Focinho de Burro	
			Camoesa Rosa	
			Bravo cl. 219	
			Bravo cl. 264	
			Bravo cl. 164	
			Bravo cl. 042	
			Malápio do IFEC	
			Durázio	
			Bravo cl. 226	
			Camoesa Corada	
			Comendador	
			Bravo cl. 065	
		Pereira	Lambe os dedos	
			Carapinheira roxa	
IBMPPraga	República Checa	Macieira	Mery	Maio de 2011

A dificuldade na obtenção de material vegetal, directamente de pomares, foi ultrapassada com a utilização de amostras provenientes do INRB, I.P., L-INIA (ex-Estação Nacional de Fruticultura Vieira da Natividade) pertencentes à Colecção Nacional de Variedades. Foi recebido material vegetal do Instituto de Biologia Molecular de Plantas de Praga, proveniente de macieira, cultivar "Mery", infectada com o fitoplasma AP, composto por três raminhos colhidos ao redor da árvore, que passou a constituir a nossa testemunha doente (C+) para a detecção dos fitoplasmas do grupo AP.

Após a colheita, o material vegetal foi conservado a -80 °C até processamento laboratorial.

No total, analisaram-se 102 amostras de material vegetal, de 24 cultivares, provenientes de cinco pomares distintos.

### **III.1.2. Material Animal**

#### **III.1.2.1. Método de captura**

As amostras de insectos foram colhidas em vários pomares de pereira, em diversas zonas do Oeste. A captura foi feita recorrendo-se à técnica das pancadas (figura 10), tendo sido realizadas duas batidas em dois ramos, em cerca de vinte árvores por hectare seleccionadas ao acaso.



**Figura 10: Técnica das pancadas em pereira para a obtenção de adultos de *Cacopsylla pyri***

### III.1.2.2. Locais de captura

Os insectos foram capturados na região Oeste, em dez pomares, nas localidades e datas indicadas no quadro 4, num total de 384.

Quadro 4: Localização dos pomares da região Oeste onde foram capturados insectos e respectivas datas de captura

Pomar	Data de Captura
Estação Nacional de Fruticultura Vieira da Natividade	Fevereiro 2011
	Junho 2011
Breja	Fevereiro 2011
Cadaval – Martim Joanes	Junho 2011
Pero Moniz	Julho 2011
Sobrena – Alguber	Julho 2011
Sobrena – Pomar abandonado	Julho 2011
Celões – Pomar biológico	Julho 2011
Cadaval	Julho 2011
Póvoa	Julho 2011
Caldas da Rainha – Seixeiro	Julho 2011

### III.1.2.3. Classificação dos insectos

Os insectos foram divididos em três grupos, quando aplicável, em machos e fêmeas adultos e ninfas, por observação à lupa (figura 11).

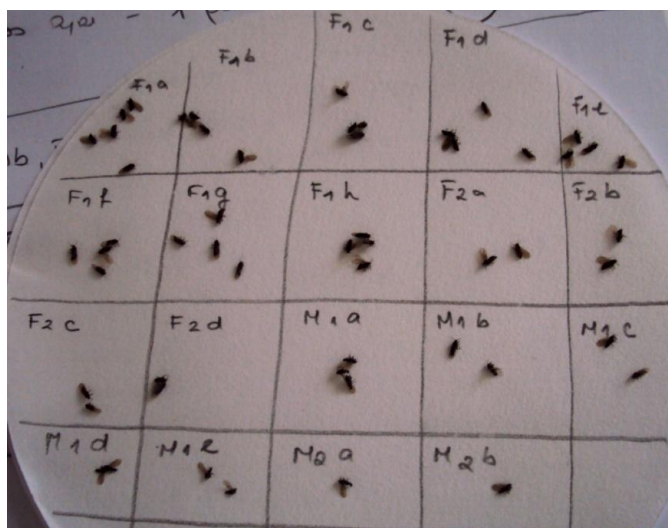


Figura 11: Divisão dos insectos por género para extracção do DNA total

## **III.2. Métodos**

### **III.2.1. Extracção do ácido nucleico total**

O ácido nucleico total foi extraído das amostras vegetais através de dois métodos: **A** – PGB/CTAB e **B** - CTAB (Angelini *et al.*, 2004), para posterior análise através de PCR. Para tal, foi utilizado o material vegetal (raminhos do ano) da testemunha doente, macieira cultivar “Mery”, infectada com AP. Para as restantes amostras utilizou-se somente o método CTAB.

Para os insectos, o ácido nucleico foi extraído recorrendo ao método CTAB 2%, com algumas alterações relativamente ao anterior.

#### **III.2.1.1. Plantas**

Para as extracções de ácido nucleico utilizaram-se as nervuras principais das folhas, pecíolos e raspas do floema do caule. Com o auxílio de um bisturi, recortaram-se as nervuras de algumas folhas e, para a obtenção das raspas do floema, retirou-se primeiro o tecido exterior (súber ou câmbio) do raminho seleccionado obtendo-se, por raspagem, o tecido floémico.

Entre cada amostra, o bisturi, a mesa de trabalho assim como as luvas foram desinfectadas com lixívia diluída a 10% em água.

Por fim, todo o material vegetal obtido foi fragmentado, homogeneizado com o auxílio de uma pinça desinfectada, colocado em sacos de plástico e congelado a -20 °C, quando não utilizado de imediato.

##### **III.2.1.1.1. Método CTAB**

Este método, adaptado e modificado de Angelini *et al.* (2004) foi aplicado às 102 amostras, compostas pelo produto fragmentado anteriormente.

Consiste em quatro fases:

#### **a) Clarificação e desnaturação**

Foi efectuado o esmagamento do material vegetal (figura 12) com tampão de extracção 2%, na proporção 1/10 p/v (1 g de produto para 10 ml de tampão), utilizando um maço (para tecidos mais lenhosos) ou um macerador de esferas (para tecidos menos rígidos).



**Figura 12: Esmagamento de material vegetal em saco Bioreba com maço**

Este procedimento foi realizado em sacos de plástico específicos (Bioreba), que contêm uma membrana sintética no meio, permeável, que permite a concentração dos resíduos num dos lados e a separação das fases líquida (tampão e seiva) da sólida (detritos lenhosos) (figura 13).



**Figura 13: Produto macerado e aspecto final da fase líquida, evidenciando as diferenças entre variedades**

Da fase líquida retiraram-se 2 ml para um tubo de polipropileno (Eppendorf) do mesmo volume e centrifugou-se, durante 5 minutos, a aproximadamente 2300 g para eliminação dos detritos lenhosos e celulósicos (clarificação); De seguida, transferiu-se o sobrenadante para novos tubos de polipropileno de 2 ml, aos quais se adicionaram 2 µl de β-mercaptoetanol, colocando-se os tubos em Banho-Maria durante, aproximadamente, 30 minutos, a 65 °C, promovendo-se assim a fase de desnaturação.

b) Precipitação e purificação do AN total

Após o Banho-Maria, retiraram-se 500 µl do soluto para novos tubos de polipropileno de 1,5 ml, aos quais se acrescentou o mesmo volume da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), de forma a bloquear a desnaturação, seguindo-se uma centrifugação durante 10 minutos a, aproximadamente, 15700 g. Transferiu-se o sobrenadante, aproximadamente 500 µl, para novos tubos de polipropileno de 1,5 ml, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol frio (nesta fase podem-se observar os filamentos de ácido nucleico em suspensão). Colocou-se a -20 °C durante 30 minutos (no mínimo) para promover a concentração e precipitação das moléculas de ANt (purificação).

c) Lavagem do DNA

Retiraram-se os tubos do frio e submeteram-se a duas lavagens com etanol, a duas concentrações – 70% e 100%. Foi efectuada uma centrifugação a 15700 g, durante 10 minutos, a 4 °C, descartando-se o sobrenadante com cuidado para não descolar o “pellet” – novelo de DNA que se formou após a centrifugação – da parede do tubo. Deixou-se secar o “pellet” à temperatura ambiente durante 15 minutos, tendo sido realizada a primeira lavagem após este passo, utilizando 1 ml de etanol a 70%. Seguiu-se nova centrifugação a 15700 g durante 5 minutos e uma posterior lavagem, após descartado o sobrenadante, com 1 ml de etanol a 100%, seguida de uma centrifugação igual à anterior.

Deixou-se a secar bem o “pellet” à temperatura ambiente para total evaporação do etanol.

d) Ressuspensão do ácido nucleico

A ressuspensão do DNA foi realizada adicionando 100 µl de água destilada e autoclavada, seguida de uma pequena agitação no “Vortex”, ficando a ressuspender a 4 °C durante a noite. Sempre que o “pellet” não apresentava uma cor translúcida procedia-se a nova lavagem.

Após todo o processo concluído, o ácido nucleico já extraído era congelado a -20 °C até posterior utilização.

#### **III.2.1.1.2. Método PGB/CTAB**

A diferença deste método para o anterior resulta numa pequena alteração na fase de clarificação onde o material vegetal foi previamente macerado com o tampão de extracção PGB, na razão de 1/10 (p/v). Colocaram-se 2 ml da solução resultante do macerado num tubo de polipropileno de igual volume e, após uma centrifugação inicial de 5 minutos a 2300 g e transferência do sobrenadante para novos tubos, procedeu-se a uma centrifugação de 20 minutos a 15700 g a 4 °C. Todo o sobrenadante era descartado, tendo sido o



precipitado ressuspendido em tampão CTAB 2%. Todo o processo seguinte foi semelhante ao descrito anteriormente, para o método CTAB.

#### **III.2.1.2. Insectos**

Utilizou-se igualmente o tampão de extração CTAB 2%. O protocolo foi executado de modo semelhante ao utilizado para o material vegetal. As psilas foram agrupadas, dependendo das quantidades capturadas nos pomares, em conjuntos de 2 a 7 ou 1 insecto, sendo atribuída uma identificação aos respectivos tubos (quadro 5). Foram colocados em microtubos de polipropileno de 1,5 ml e esmagados com o auxílio de um pequeno pilão, em 200 µl de tampão (figura 14). Após bem triturados, adicionaram-se outros 200 µl de tampão e incubaram-se durante 5 minutos em Banho-Maria a 65 °C.



**Figura 14: Maceração dos insectos em tubo de polipropileno**

Posteriormente, juntaram-se 400 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguindo-se uma centrifugação de 5 minutos a 15700 g, após a qual se recuperou o sobrenadante para novos tubos. Foram, então, adicionados 400 µl de isopropanol frio (igual ao volume do sobrenadante) e centrifugou-se durante 15 minutos a 15700 g.

Eliminado o sobrenadante, deu-se início à lavagem do “pellet”, adicionando-se 400 µl de etanol a 70%, seguido de centrifugação durante 5 minutos a 15700 g. Descartou-se o etanol e deixou-se secar bem o “pellet”, o qual se ressuspendeu em 100 µl de água bi-destilada e autoclavada.

**Quadro 5: Identificação dos tubos das amostras de psilas submetidas a análise por PCR, indicando o género e data de extracção das mesmas**

<b>Data Captura</b>	<b>Género</b>	<b>Identificação dos tubos das amostras</b>	<b>Data Extracção</b>
Fevereiro 2011	Fêmea	F1a-h	Maio de 2011
	Macho	M1a-e	Maio de 2011
Fevereiro 2011	Fêmea	F2a-F2d	Maio de 2011
	Macho	M2a-M2b	Maio de 2011
Junho de 2011	Fêmea	Fc1-15	Junho de 2011
	Macho	Mc1-3	Junho de 2011
Julho de 2011	Fêmea	ENF F	Julho de 2011
	Macho	ENF M	Julho de 2011
Julho de 2011	Fêmea	Pov F	Julho de 2011
	Macho	Pov M	Julho de 2011
Julho de 2011	Fêmea	Cel F1-2	Julho de 2011
	Macho	Cel M	Julho de 2011
Julho de 2011	Fêmea	Cad F1-2	Julho de 2011
	Macho	Cad M1-2	Julho de 2011
Julho de 2011	Fêmea	Sob F1-3	Julho de 2011
	Macho	Sob M1-3	Julho de 2011
Julho de 2011	Fêmea	PM F1-15	Julho de 2011
	Macho	PM M1-6	Julho de 2011
	Ninfa	PMN	Julho de 2011
Julho de 2011	Fêmea	Cald F1-3	Julho de 2011
	Macho	Cald M1-2	Julho de 2011
Julho de 2011	Fêmea	Alg F1-3	Julho de 2011
	Macho	Alg M1-2	Julho de 2011

### **III.2.2. Leitura da concentração dos ácidos nucleicos**

#### **III.2.2.1. Por espectrofotometria**

Foi este o método mais utilizado para leitura da concentração de DNA nas amostras. Em solução aquosa, o DNA tem absorvância máxima a 260 nm, enquanto que as proteínas absorvem perto dos 280 nm. A pureza do DNA foi avaliada pela razão entre estes 2 valores que deve situar-se entre 1,7 e 2,0.

Nas medições das concentrações do ácido nucleico das amostras foi utilizado um espectrofotómetro Biorad: "SmartSpec 3800" (figura 15).



**Figura 15: Espectrofotómetro Biorad: "SmartSpec 3800, utilizado para medir as concentrações de ácido nucleico total e contaminantes presentes nas amostras**

As amostras do ácido nucleico total foram diluídas 1:50 (2 µl de ácido nucleico e 98 µl de água destilada); os 100 µl eram colocados em cuvetes próprias e de seguida introduzidas no espectrofotómetro, procedendo-se, então, à leitura das absorvâncias em 3 comprimentos de onda: 260 nm (DNA), 280 nm (proteínas) e 320 nm (contaminantes). Os resultados das concentrações de ácido nucleico foram obtidos em µg/ml.

#### **III.2.2.2. Por PicoGreen**

O PicoGreen é um fluoróforo ultra-sensível utilizado para a quantificação de DNA, em cadeia dupla (dsDNA), em solução. Permite a quantificação de dsDNA mesmo quando presente em muito baixas quantidades, como por exemplo, 25 pg/ml. Os comprimentos de onda utilizados são de 485 nm e 520 nm para a excitação e para a emissão, respectivamente. A determinação da concentração de soluções de DNA é feita por intermédio do estabelecimento de rectas de calibração com λDNA com concentração bem conhecida. A linearidade das medições é mantida mesmo na presença de compostos comumente encontrados como contaminantes das preparações de ácidos nucleicos tais como sais, etanol, clorofórmio, detergentes e proteínas. Selectivamente, liga-se ao DNA de dupla cadeia sendo mínima a contribuição da fluorescência proveniente de RNA e de DNA em cadeia simples nos resultados de quantificação.

Para determinar a concentração das amostras é necessário, em primeiro lugar, efectuar uma recta de calibração standard, podendo observar-se os volumes necessários no quadro 6.

**Quadro 6: Volumes necessários para efectuar a recta de calibração padrão na quantificação do DNA das amostras da testemunha doente**

Posição no rotor	Vol. de $\lambda$ DNA [10 ng/ $\mu$ l] [ $\mu$ l]	Vol. H <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]	Vol. reagente Quant-iT™ PicoGreen diluído (200x) [ $\mu$ l]	Concentração final do $\lambda$ DNA [ng/ $\mu$ l]
1,2,3	5	0	45	1
4,5,6	4	1	45	0,8
7,8,9,	3	2	45	0,6
10,11,12	2	3	45	0,4
13,14,15	1	4	45	0,2
16,17,18	0	5	45	0

As 18 posições iniciais do rotor destinaram-se à recta de calibração. Para as amostras de DNA a quantificar, foram utilizadas as posições seguintes. Cada amostra quantificada em duplicado. Para a reacção, utilizaram-se 45  $\mu$ l de reagente Quant-iT™ PicoGreen diluído, 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O e 3  $\mu$ l de DNA.

O rotor foi colocado no termociclador de Real-time PCR (Rotor-Gene Q6000 – Qiagen), conectado a um computador, e aplicou-se o seguinte programa: 30 segundos a 94 °C e 3 repetições de 30 segundos a 65 °C. Finalizado o programa, os resultados foram processados pelo “software” (Rotor-Gene 1.7.94) do próprio instrumento e depois interpretados.

### **III.2.3. Amplificação do DNA por PCR convencional**

#### **III.2.3.1. Amplificação do DNA de fitoplasma por nested-PCR**

Todas as amostras foram sujeitas a amplificação por nested-PCR com iniciadores específicos para a região ribossomal 16SrX e grupo AP. Para a detecção destes fitoplasmas seguiu-se o protocolo utilizado em testes interlaboratoriais do consórcio Euphresco-2010, com algumas modificações, como a utilização da “mix” de reacção e da enzima *Taq* DNA polimerase da Fermentas, em uso no laboratório.

O nested-PCR consiste em 2 reacções de PCR, sendo a primeira com um par de iniciadores universal, P1 (5'AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT3') - P7 (5'CGTCCTTCATCGGCTCTT3') (Schneider *et al.*, 1995), e a segunda com um par de iniciadores específico para este grupo, f01 (CGG AAA CTT TTA GTT TCA GT) - r01 (AAG TGC CCA ACT AAA TGA T) (Lorenz *et al.*, 1995), que originará um amplicão de 1050 pb do gene 16SrDNA, a região mais conservada do genoma dos fitoplasmas.

A “mix” foi sempre preparada de acordo com a composição descrita no quadro 7. A reacção decorreu em tubos de 0,2 ml, agregados em “strips” de 8 microtubos mas com tampas individuais.

**Quadro 7: Concentração e quantidade de reagentes para a "mix" de reacção para nested-PCR**

Concentração	Composição	1X (µl)
-	dH <sub>2</sub> O	19,6
10 x	Tampão	3
10 mM	dNTP's	0,6
25 mM	MgCl <sub>2</sub>	3,6
10 µM	Iniciador "forward"	1
10 µM	Iniciador "reverse"	1
5 U/µl	Taq DNA Polimerase	0,2
	Volume total	29

Em cada tubo colocaram-se 29 µl da "mix" e 1 µl do ácido nucleico previamente extraído da planta ou do insecto. Em cada reacção de PCR adicionou-se, pelo menos, um controlo positivo ("mix" + DNA extraído de planta infectada) e um controlo negativo ("mix" + água), para despiste de contaminações.

Para cada par de iniciadores teve que se utilizar uma temperatura de hibridação diferente, de acordo com a sua composição nucleotídica. Os programas de amplificação encontram-se descritos no quadro 8.

**Quadro 8: Programa de amplificação para os iniciadores P1-P7 e f01-r01**

	P1-P7		f01-r01	
	Tempo [min]	Temperatura [°C]	Tempo [min]	Temperatura [°C]
Desnaturação inicial	2	94	2	94
Desnaturação	1	94	1	94
Hibridação	1	55	1	50
Extensão	2	72	2	72
Extensão final	8	72	8	72
Fim (conservação)	∞	4	∞	4
Ciclos	36		38	

As amplificações realizaram-se num termociclador de PCR convencional, "Programmable Thermal Controller" 100 da "MJ Reserach", observável na figura 16.



**Figura 16: Termociclador de PCR convencional, "Programmable Thermal Controller" 100 da "MJ Reserach"**

### III.2.3.2. Amplificação do DNA de insecto

A amplificação de DNA de insecto, inserida no processo de detecção de fitoplasmas, visou assegurar a ausência de falsos negativos, os quais poderiam dever-se à baixa concentração de ácido nucleico no extracto ou à presença de inibidores da reacção.

Com os iniciadores universais LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HC02198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994), amplificou-se um fragmento de cerca de 710 pb da subunidade I do gene mitocondrial da citocromo c oxidase. Este teste não foi aplicado a todos os extractos de DNA de insectos. Ao acaso, seleccionaram-se extractos obtidos a partir amostras compostas por 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 insectos.

A mistura de reacção ("mix") foi preparada de acordo com a composição descrita no quadro 9. A reacção decorreu em tubos de 0,2 ml, agregados em "strips" de 8 microtubos com tampas individuais.

**Quadro 9: Concentração e quantidade de reagentes para a "mix" de reacção para amplificação de DNA de insecto com os iniciadores LCO1490 e HC02198**

Reagentes	Volumes/reacção (µl)
Tampão de <i>Taq</i> (5x)	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5
dNTP's (1 mM)	2
Iniciador LCO1490 (10 mM)	1,25
Iniciador HC02198 (10 mM)	1,25
<i>Taq</i> DNA polymerase	0,5
Água	7,5
DNA	5
Volume total	25

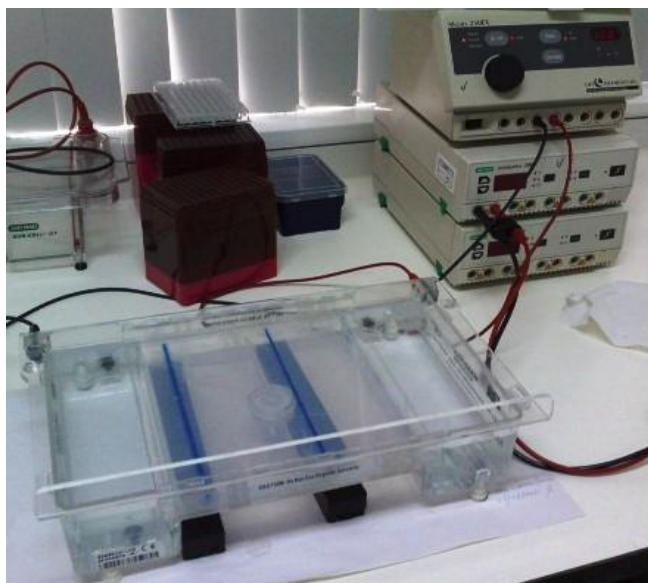
### III.2.4. Electroforese

As electroforeses foram sempre realizadas em gel de agarose a 1%, ou seja, 1 g de agarose em pó (Biorad) para 100 ml de tampão TAE 1X (Biorad), tendo sido a mistura dissolvida num forno microondas, sendo posteriormente arrefecida para se adicionar o brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/ml.

A tensão aplicada e a duração da migração dos fragmentos de DNA no gel de agarose dependem directamente do tamanho da tina, da concentração do gel e do tamanho dos fragmentos de DNA a separar. Em cada poço colocaram-se 6 µl de produto da PCR, homogeneizados com, aproximadamente, 2 µl de azul de bromofenol, corante utilizado para monitorizar a migração dos fragmentos de DNA e para aumentar a densidade da amostra, permitindo-lhe depositar-se no fundo do poço.

Utilizou-se o marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen), de 100 a 3000 pb, o que o torna, portanto, adequado à visualização da banda dos fitoplasmas, 1050 pb.

A electroforese foi conduzida com voltagem constante de 90 a 100 V, em tampão de corrida TAE 1X (figura 17).



**Figura 17: Corrida electroforética de amostras com uma tensão constante de 100 V**

Para leitura do gel utilizou-se um leitor de UV (Fluor S Multimager Biorad) que permite, através do programa “Fluor S” (figura 18), captar, gravar e trabalhar as imagens do gel obtidas num computador conectado ao aparelho.



**Figura 18: Leitor de UV (Fluor S Multimager Biorad) utilizado na leitura do gel de electroforese**

### III.2.5. Amplificação do DNA por Real-Time PCR

#### III.2.5.1. Amplificação do DNA de planta (gene COX)

Este método foi utilizado somente nas amostras de macieira provenientes da República Checa, testemunha doente. A amplificação com os iniciadores Cox-F (CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA) e Cox-R (CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG) e com a sonda Cox-P (VIC-5'- TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-3' TAMRA), específicos para este complexo, permitiu confirmar a presença de DNA de origem vegetal, assim como a sua amplificabilidade, pois a sua concentração era muito baixa (Jaraush *et al.*, 2000).

O método foi desenvolvido e publicado (Hodgetts *et al.*, 2009) referindo o uso de uma “mix” comercializada pela Applied Biosystems, também utilizada neste trabalho, (TaqMan Universal PCR Master Mix (Cat. no. 4304437)). A esta só foi necessário adicionar água, iniciadores (“reverse” e “forward”) e a sonda referida anteriormente.

Para uma amostra utilizam-se 12,5 µl de “Master Mix” (2x), 5 µl de água ultrapura (tipo Milli Q), 0,75 µl do iniciador “forward” (10 µM), 0,75 µl do iniciador “reverse” (10 µM) e 1 µl de sonda (2,5 µM), perfazendo um volume total de 20 µl.

As reacções ocorreram no termociclador Rotor-Gene 6000Q, para real-time PCR. Este equipamento é constituído por um rotor ao qual se podem ligar três carrosséis de diferentes capacidades: o carrossel de maior capacidade tem 100 orifícios e foi desenvolvido recentemente. Permite a utilização de um anel de polipropileno constituído por 100 microtubos não destacáveis de 25 µl de capacidade; o carrossel médio tem capacidade para 72 tubos de 50 µl agrupados em “strips” de 4 tubos e o carrossel menor leva 36 tubos de 0,2 ml, individuais (figura 19). Assim, dependendo do número de amostras, escolhe-se o carrossel e o tipo de tubo a utilizar.



**Figura 19:** Termociclador Rotor-Gene 6000Q para real-time PCR, conectado ao computador e aspecto dos diferentes carrosséis possíveis de utilizar.



Em cada microtubo foram colocados 20 µl de “mix” e 5 µl de DNA. Todas as amostras foram analisadas em duplicado ou em triplicado.

O termociclador encontra-se conectado a um computador com “software” apropriado (Rotor Gene 1.7.94) que controla toda a reacção e permite a análise de resultados.

Para este método, utilizou-se o seguinte programa: 1) descontaminação durante 2 minutos a 50 °C por acção do enzima “uracil-DNA glycosylases” (UNG) que remove resíduos de uracilo de moléculas de DNA por corte das ligações N-glicosílicas; 2) desnaturação inicial durante 10 minutos a 95 °C; 3) 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C (desnaturação) e 1 minuto a 60 °C (hibridação e alongamento).

#### **III.2.5.2. Método “Christensen”**

Seguindo o protocolo descrito por Christensen *et al.* (2004), foi utilizada uma sonda do tipo TaqMan marcada na sua extremidade 5' com o “reporter” 6-FAM (6 carboxifluoresceína) e no nucleótido terminal 3' com o “quencher” TAMRA (“tetra-methylcarboxyrhodamine”). Este protocolo permite a amplificação de um fragmento da sequência 16SrDNA de diversos fitoplasmas do grupo AP ou 16SrX, mas não de bactérias.

Como foi referido anteriormente, por amostra, utilizam-se 12,5 µl de “Master Mix” (2x), 3,5 µl de água, 0,75 µl do iniciador “forward” (10 µM), 2,25 µl do iniciador “reverse” (10 µM) e 1 µl de sonda (2,5 µM), num total de 20 µl.

Como anteriormente, o rotor utilizado no Rotor-Gene dependeu do número de amostras a analisar, sendo todo o procedimento posterior semelhante.

O programa, para este método, é composto por 1 passo de descontaminação durante 2 minutos a 50 °C e 1 de desnaturação inicial durante 10 minutos a 95 °C seguidos de 45 ciclos de desnaturação durante 15 segundos a 95 °C e hibridação e alongamento durante 1 minuto a 60 °C.

#### **III.2.5.3. Método NIB**

Este método foi desenvolvido pelo “National Institute of Biology” (NIB) da Eslovénia, sendo aplicado na detecção de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrX. É composto por três procedimentos para a detecção específica de “*Candidatus*” fitoplasma mali, de “*Candidatus*” fitoplasma pyri e de “*Candidatus*” fitoplasma prunorum. Cada detecção usa uma sonda TaqMan marcada com na sua extremidade 5' com o “reporter” 6-FAM e no nucleótido terminal 3' com o “quencher” MGB (“Minor Groove Binder”).

Pelas razões anteriormente mencionadas, só foi utilizado o procedimento para a confirmação do “*Candidatus*” fitoplasma pyri em algumas amostras que deram resultado positivo para a presença de fitoplasma em nested-PCR.

O método foi desenvolvido utilizando uma “mix” comercializada pela Fermentas (2x Máximatm qPCR Master Mix, Cat. No. K0232) e que neste trabalho também se utilizou. A esta só foi necessário adicionar água, iniciadores (“reverse” e “forward”) e a sonda referida anteriormente.

Por amostra, utilizam-se 12,5 µl de “Master Mix” (2x) e 2,10 µl de água, 2,25 µl do iniciador “forward” (10 µM) e 2,25 µl do iniciador “reverse” (10 µM) e 0,9 µl de sonda (2,5 µM), num total de 20 µl. Como anteriormente, o rotor utilizado no Rotor-Gene dependeu do número de amostras a analisar, sendo todo o procedimento posterior e programa de amplificação semelhante ao anterior.

### **III.2.6. Sequenciação e identificação de ácido nucleico amplificado**

Após a amplificação do DNA de fitoplasma por nested-PCR, cinco das amostras reveladas positivas, após a electroforese em gel de agarose, foram isoladas, extraídas da agarose, purificadas e sequenciadas. Para tal, com uma lâmina de bisturi desinfetada cortaram-se minuciosamente as bandas colocando a fatia de agarose num microtubo de polipropileno de 1,5 ml. A extracção e purificação realizou-se com “Gel DNA Recovery Kit” (ZymoResearch). As amostras foram enviadas para sequenciação automática (Stabvida, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda). Quatro amostras foram sequenciadas no sentido “forward” e apenas uma delas foi sequenciada nos dois sentidos, “forward” e “reverse”.

Para a análise das sequências obtidas recorreu-se a vários programas existentes nas bases de dados de sequências genómicas, disponíveis “online”. As sequências de DNA foram comparadas consultando as bases de dados do EMBL (EMBL/GenBank: <http://www.ebi.ac.uk>) e do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>). A aplicação BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizada para a pesquisa de sequências homólogas às obtidas neste trabalho e publicadas nessa base de dados e seu alinhamento e, por fim, a aplicação CLUSTALW2 (Thompson *et al.*, 1994) para alinhamento múltiplo dos nucleótidos, para obtenção da sequência “consensus”.

### **III.2.7. RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)**

#### **III.2.7.1. RFLP virtual**

No “site” <http://tools.neb.com/NEBcutter2> pode-se determinar, a partir de uma sequência nucleotídica, quais as enzimas se podem utilizar na digestão do produto da PCR de modo a obter padrões de restrição diferenciadores de estirpes ou mesmo de fitoplasmas do grupo em estudo, assim como obter os perfis electroforéticos virtuais das enzimas de restrição utilizadas.

### **III.2.7.2. RFLP real**

O produto da PCR foi sujeito a digestão enzimática por parte de duas enzimas: *Bmfi* (*Sfci*) e *Sspl* (Fermentas). Adicionou-se a 10 µL de suspensão de produto de PCR, 2 µl de enzima, 2 µl tampão G (10X) e 6 µl de H<sub>2</sub>O. A digestão decorreu durante um período de 16 horas, a 37 °C em estufa previamente aquecida. Posteriormente, efectuou-se uma electroforese em gel de agarose (1 %) para verificar o padrão de restrição.

## IV. Resultados e discussão

### IV.1. Comparação de métodos

#### IV.1.1. Comparação de métodos de extracção, quantificação e purificação de ácido nucleico em amostras de material vegetal proveniente da testemunha doente

Para comparar os dois métodos de extracção de ácidos nucleicos (**A** – PGB/CTAB e **B** - CTAB) utilizou-se o material vegetal da testemunha doente (cultivar “Mery”) infectada com o fitoplasma AP.

A razão pela qual o DNA é extraído maioritariamente de pecíolos e nervuras das folhas foi demonstrada por (Christensen *et al.*, 2004). Nos pecíolos, a concentração de DNA fitoplásmico é 10 a 15 vezes superior à concentração nas raízes. Já nas folhas, a concentração de DNA fitoplásmico é 40 vezes superior.

Dos raminhos e folhas recebidos foram constituídas três amostras (1, 2 e 3), que foram extraídas por ambos os métodos. Em cada método, cada amostra foi extraída em quadruplicado (réplicas a, b, c e d). A concentração de DNA foi medida em todas as suspensões por espectrofotometria e por fluorimetria (PicoGreen) (quadro 10).

**Quadro 10: Concentração de DNA nas amostras de macieira infectada obtida por Fluorimetria. As reacções ocorreram num volume total de 50 µL e com 5 µL de suspensão de DNA**

Amostra		Média da Conc. [ng/reacção]	Conc. Sol. Usada para Picogreen [ng/µl]	Conc. Sol. Original [ng/µl]	Média por amostra [ng/µl]
A1	a	6,45	2,15	2,15	2,22
	b	7,46	2,49	2,49	
	c	6,50	2,17	2,17	
	d	6,24	2,08	2,08	
A2	a	7,82	2,61	2,61	2,45
	b	7,27	2,42	2,42	
	c	6,81	2,27	2,27	
	d	7,48	2,49	2,49	
A3	a	7,41	2,47	2,47	2,49
	b	7,58	2,53	2,53	
	c	7,34	2,45	2,45	
	d	7,57	2,52	2,52	
B1	a	10,69	3,56	3,56	3,04
	b	8,14	2,71	2,71	
	c	9,79	3,26	3,26	
	d	8,02	2,67	2,67	
B2	a	8,00	2,67	2,67	3,51
	b	12,60	4,20	4,20	
	c	10,89	3,63	3,63	
	d	10,62	3,54	3,54	
B3	a	13,15	4,38	4,38	4,55
	b	10,82	3,61	3,61	
	c	14,17	4,72	4,72	
	d	16,48	5,49	5,49	

A fluorimetria permitiu determinar a concentração do dsDNA em suspensão, mas não permitiu inferir sobre a sua pureza. Por sua vez, a espectrofotometria, pela razão A260/A280, razão entre absorvâncias do DNA (260 nm) e as absorvâncias das proteínas (A280), permite avaliar a pureza do DNA, com valores observáveis no quadro 11.

**Quadro 11: Valores da concentração de DNA e contaminantes (A260/A280) obtidos por espectrofotometria, com diluição de 1:50 dos ácidos nucleicos**

Amostra	Concentração total [ng/μl] Ab.260 nm x 50x50	Média por amostra [ng/μl]	A260/A280
A1a	20,33	197,84	4,0634
A1b	524,83		1,8981
A1c	129,99		1,4237
A1d	116,20		1,6882
A2a	107,52	173,98	1,8308
A2b	135,68		2,0280
A2c	111,85		1,8299
A2d	340,88		1,3926
A3a	51,55	50,57	1,7796
A3b	92,19		1,5445
A3c	16,92		0,5028
A3d	41,63		0,6809
B1a	180,97	116,99	1,0877
B1b	126,84		1,8427
B1c	82,49		1,1556
B1d	77,67		1,1610
B2a	65,72	73,45	1,0190
B2b	93,41		1,2762
B2c	50,97		0,5867
B2d	83,70		1,1991
B3a	-22,15	94,90	-0,7645
B3b	261,89		1,6860
B3c	97,07		0,9590
B3d	42,79		0,5694

A espectrofotometria, apesar de simples e rápida, não é a mais apropriada pois na leitura da absorvância, inúmeras moléculas podem causar interferência. É o que se chama de contaminantes. Entre eles encontram-se nucleotídeos, RNA e EDTA provenientes dos tampões de extração, podendo influenciar negativamente a amplificação dos ácidos nucleicos por PCR.

Por análise dos quadros, pode afirmar-se que a leitura de concentração de ácidos nucleicos por espectrofotometria não é tão precisa como a leitura de concentração de ácidos nucleicos por 'PicoGreen', como já terá sido referido por diversos autores (Gallagher & Desjardins, 2008). A razão A260/A280 é muito baixa para a grande maioria das amostras, o que indica que há um elevado número de proteínas e outros contaminantes (A280 e A320) que podem influenciar negativamente a amplificação do ácido nucleico por PCR. Podem,

também, verificar-se algumas irregularidades como valores negativos. Esses valores podem ser explicados por erros de manuseamento ou mesmo por falta de precisão do método.

Através duma análise de variância a 2 factores com repetição, para  $\gamma = 0,05$ , temos o valor de F calculado ligeiramente superior ao valor de F tabelado, pelo que se pode afirmar, rejeitando a hipótese de inexistência de efeitos dos métodos, que estes são significativamente diferentes, quando comparados os valores da razão A260/A280 de ambos (quadro 12).

**Quadro 12: Análise de variância a 2 factores com repetição para a razão A260/A280 (pureza do ácido nucleico) obtida por espectrofotometria, com  $\gamma = 0,05$ .**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	valor P	F tabelado
Amostra	3,4109	2	1,70545	3,181305	0,065605	3,554557
Método	3,289005	1	3,289005	6,13523	0,023402	4,413873
Interacções	0,195756	2	0,097878	0,18258	0,834642	3,554557
Dentro	9,649531	18	0,536085			
Total	16,54519	23				

Numa análise de variância com os mesmos parâmetros da anterior, para os dados da concentração das amostras por espectrofotometria, obtiveram-se os resultados apresentados no quadro 13.

**Quadro 13: Análise de variância a 2 factores com repetição para concentração de DNA obtida por espectrofotometria, com  $\gamma = 0,05$**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	valor P	F tabelado
Amostra	29079,58422	2	14539,792	1,079031	0,36092212	3,554557
Método	12522,71535	1	12522,715	0,929339	0,34780836	4,413873
Interacções	24694,44657	2	12347,223	0,916316	0,41785877	3,554557
Dentro	242547,4563	18	13474,859			
Total	308844,2025	23				

Analisando o quadro 13, podemos dizer que, comparando as concentrações de DNA das amostras, obtidas por espectrofotometria, os métodos não são significativamente diferentes pois o valor de F calculado é muito inferior ao tabelado.

O mesmo não se pode dizer para o método de quantificação de DNA por fluorimetria (quadro 14) onde, logo pela observação do quadro, se pode dizer que o método A permite obter suspensões mais concentradas que o método B, o que poderá levar a pensar que existem diferenças entre métodos. A mesma análise estatística, para  $\gamma = 0,05$ , confirma esta hipótese, pois obteve-se um F calculado muito superior ao tabelado.

**Quadro 14: Análise de variância a 2 factores com repetição para concentração de DNA obtida por fluorimetria, com  $\gamma = 0,05$**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	valor P	F tabelado
Amostra	28,655575	2	14,32779	7,606856	0,004033	3,554557
Método	93,773067	1	93,77307	49,78565	1,4E-06	4,413873
Interacções	15,343358	2	7,671679	4,073019	0,034738	3,554557
Dentro	33,90365	18	1,883536			
Total	171,67565	23				

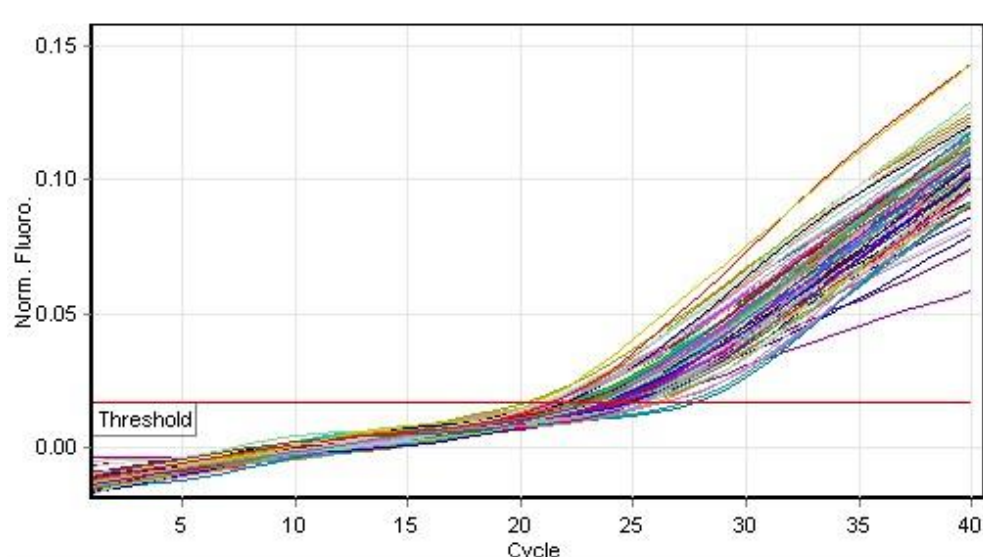
Estes resultados estão de acordo com a OEPP e Boudon-Padieu (2003) que referem que o método PGB é o mais eficiente para extracção de DNA de fitoplasmas, embora mais moroso, sendo por isso menos conveniente em rotinas.

De seguida, procedeu-se à amplificação do ácido nucleico por real-time PCR.

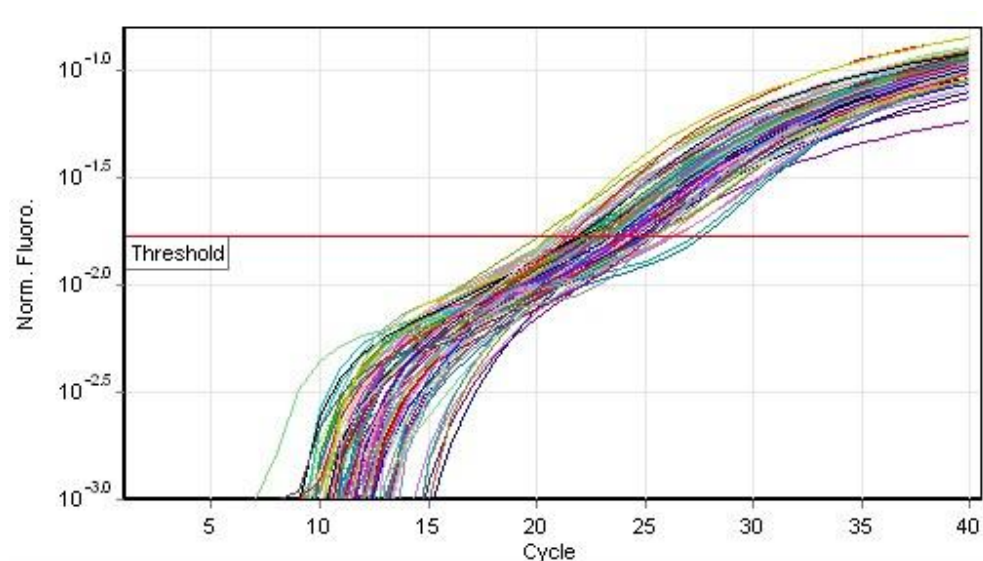
Primeiro, foi utilizado o ensaio para o gene COX (Hodgetts *et al.*, 2009) para averiguar se as suspensões de DNA não continham inibidores em quantidades que impedissem totalmente a reacção de amplificação. Assim, avaliaram-se também as diferenças de amplificação entre os extractos obtidos pelos dois métodos de extracção utilizados neste trabalho. Cada suspensão de DNA e respectiva diluição foram utilizadas em duplicado para se conseguir observar a variação de Ct. DNA com elevado grau de purificação permite uma variação de 3,23 Ct entre a suspensão original e a sua diluída numa razão de 1:11.

Na figura 20 podemos observar as curvas de amplificação obtidas para todas as amostras deste estudo. A linha de “threshold” foi colocada manualmente, o mais próximo possível da base das curvas de amplificação, uma vez que as suspensões de DNA tinham diferentes graus de pureza e, portanto, o ensaio não apresentou linearidade. O ponto de intersecção da curva com a linha de “threshold” indica o valor de Ct. Pode observar-se que todas as amostras amplificaram o fragmento do complexo citocromo c-oxidase, indicando que a qualidade do ácido nucleico era adequada para ser amplificado por PCR.

Outra maneira para colocar a linha de “threshold” é converter as curvas na sua forma logarítmica e colocar a linha na fase linear da curva de amplificação, como se poderá observar na figura 21.



**Figura 20:** Curvas de fluorescência que ilustram a amplificação em tempo-real do fragmento do gene Cox. A fluorescência registrada para cada amostra é aquela que atinge um limiar de detecção (linha horizontal a vermelho) por convenção denominado de Ct. A figura mostra as curvas de fluorescência de todas as amostras testadas em duplicado. A fluorescência emitida antes do nível do Ct para cada curva é considerada ruído de fundo (*background*).



**Figura 21:** Curvas de fluorescência em escala logarítmica que ilustram a amplificação em tempo-real do fragmento do gene Cox.

Para os cálculos subsequentes foi utilizada a média dos valores de Ct dos duplicados sempre que a diferença entre estes não foi superior a 1,5 Ct. Variações superiores foram atribuídas a erros de pipetagem.



No quadro 15, verifica-se que os métodos apresentam valores de |Ct Concentrado-Ct Diluído| distintos, afastando-se mais os resultados do protocolo B do valor esperado para a diferença de Ct entre concentrados e diluídos. A eliminação de duplicados ou triplicados é possível e admissível perante regras previamente estabelecidas. Não se podem eliminar amostras mas podem-se eliminar duplicados sempre que uma justificação técnica bem fundamentada possa ser aplicada. Quando variância de Ct foi superior a 1,5, um dos duplicados foi removido dos cálculos (valor rasurado no quadro 15). A escolha do duplicado a manter teve como base a aproximação aos Ct das subamostras pertencentes à mesma amostra. Variações superiores foram atribuídas a erros de pipetagem, falta de homogeneidade na distribuição do DNA no extracto, falta de homogeneidade na distribuição dos inibidores e raridade das moléculas de DNA.

**Quadro 15: Resultados em Ct das amostras concentradas e diluídas, obtidos pela amplificação do gene COX por real-time PCR e o módulo da sua diferença.**

Amostra	Amostras concentradas	Amostras diluídas	Concentrado-Diluído
A1a	22,52 ( <del>24,41</del> )	(26,40+26,21)/2 = 26,305	3,785
A1b	23,19 ( <del>24,97</del> )	26,31 ( <del>23,96</del> )	3,120
A1c	(22,61+23,16)/2 = 22,885	(25,34+24,76)/2 = 25,05	2,165
A1d	(21,82+20,97)/2 = 21,395	(27,25+27,67)/2 = 27,46	6,065
A2a	(22,37+21,60)/2 = 21,985	(24,58+24,14)/2 = 24,36	2,375
A2b	21,99 ( <del>24,35</del> )	(25,25+24,82)/2 = 25,035	3,045
A2c	(21,76+20,87)/2 = 21,315	(24,38+24,73)/2 = 24,555	3,24
A2d	(21,15+20,77)/2 = 20,96	(25,28+24,86)/2 = 25,07	4,11
A3a	(23,31+23,72)/2 = 23,515	(24,50+24,08)/2 = 24,29	0,775
A3b	(21,12+21,63)/2 = 21,375	(24,69+25,03)/2 = 24,86	3,485
A3c	(21,37+20,09)/2 = 20,73	(24,18+24,07)/2 = 24,125	3,395
A3d	(23,03+22,60)/2 = 22,815	(25,04+25,13)/2 = 25,085	2,27
B1a	(24,25+25,10)/2 = 24,675	24,00 ( <del>22,33</del> )	0,675
B1b	22,57 ( <del>24,48</del> )	(22,08+22,30)/2 = 22,19	0,38
B1c	22,39 ( <del>24,88</del> )	22,97 ( <del>25,29</del> )	0,58
B1d	(22,56+23,53)/2 = 23,045	23,37 ( <del>25,09</del> )	0,325
B2a	(23,07+22,81)/2 = 23,045	(23,04+21,64)/2 = 22,34	0,705
B2b	21,93 ( <del>24,18</del> )	(22,74+22,46)/2 = 22,6	0,67
B2c	(23,44+23,85)/2 = 23,645	(23,19+22,54)/2 = 22,865	0,78
B2d	23,86 ( <del>25,94</del> )	(23,30+23,64)/2 = 23,47	0,39
B3a	(21,95+22,19)/2 = 22,57	(23,40+23,78)/2 = 23,59	1,02
B3b	(21,82+22,27)/2 = 22,045	24,10 ( <del>20,90</del> )	2,055
B3c	22,49	23,39 ( <del>25,45</del> )	0,9
B3d	21,10	(22,77+23,01)/2 = 22,89	1,79

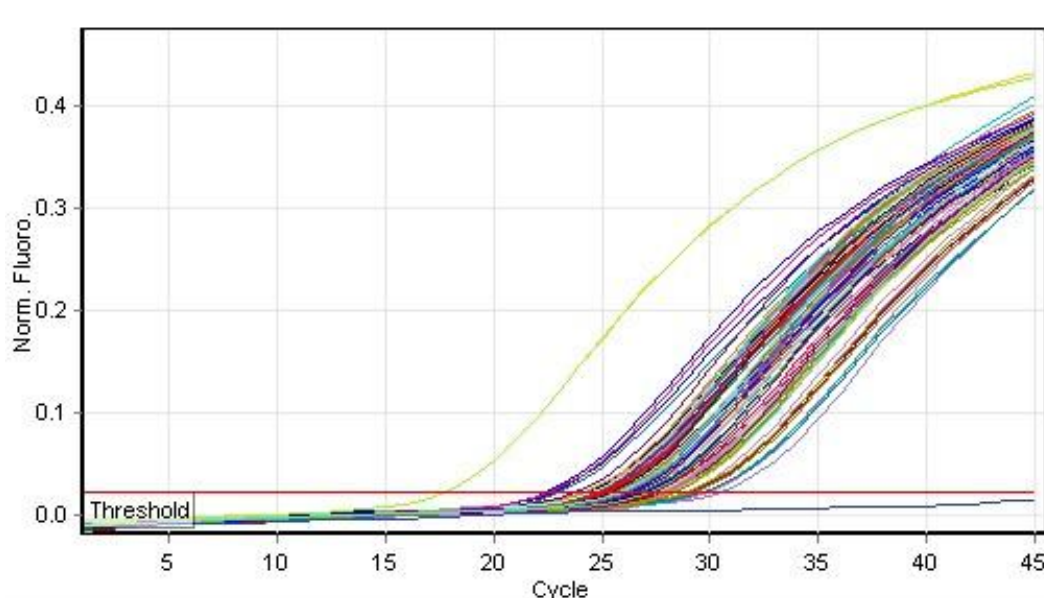
A análise de variância (quadro 16) feita para  $\gamma = 0,05$  comprova que há diferenças significativas entre os métodos pois o F calculado é superior ao tabelado, não havendo, no entanto, diferenças significativas entre amostras pois o F calculado é inferior ao tabelado, rejeitando a hipótese de efeitos do factor. A interacção entre os métodos e as amostras não é, também, estatisticamente significativa.

**Quadro 16: Análise de variância a 2 factores, com repetição, para  $\gamma = 0,05$  comparando os valores obtidos na amplificação do gene COX por real-time PCR**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	valor P	F tabelado
Amostra	0,212108	2	0,106054	0,078798	0,924544	3,554557
Método	17,51042	1	17,51042	13,01015	0,002016	4,413873
Interacções	0,893433	2	0,446717	0,331908	0,721852	3,554557
Dentro	24,22628	18	1,345904			
Total	42,84223	23				

Como se sabia serem amostras positivas para um dos fitoplasmas em estudo, o “*Candidatus*” fitoplasma mali, efectuou-se uma outra amplificação utilizando o método “Christensen”, utilizando os ácidos nucleicos sem diluição e com diluição 1:11, sempre em duplicados com o objectivo de avaliar a presença de inibição.

Na figura 22, as amostras apresentam-se bastante homogéneas, o que se pode observar pela quase sobreposição das curvas.



**Figura 22: Curvas de fluorescência que ilustram a amplificação em tempo-real pelo método Christensen. A fluorescência registada para cada amostra é aquela que atinge um limiar de detecção (linha horizontal a vermelho) por convenção denominado de Ct. A figura mostra as curvas de fluorescência de todas as amostras testadas em duplicado. A fluorescência emitida antes do nível do Ct para cada curva é considerada ruído de fundo (*background*).**

Na análise dos valores de Ct pode comprovar-se a homogeneidade das amostras (quadro 17).

Verifica-se, assim, a positividade de todas as amostras provenientes de macieira infectada. Abaixo da linha de “threshold” está o controlo negativo do tipo NPC (“Non Template Control”), a única amostra que não amplificou.

Foi utilizada a média dos valores de Ct dos duplicados para o estudo comparativo. O módulo da diferença entre a média dos valores de Ct dos concentrados com a média dos valores de Ct dos diluídos, ou seja, a variância dos valores Ct, terá de ser semelhante a

3,23. Caso seja muito diferente, pode dizer-se que o ácido nucleico contém muitos inibidores. Isto deve-se à linearidade da reacção e à proporcionalidade entre os valores de Ct e o logaritmo destes.

Após amplificação das amostras para detecção de fitoplasmas do grupo AP, analisando os valores de Ct presentes no quadro 17, facilmente se observa que o Método A dá origem a uma suspensão mais pura. Apesar deste método apresentar baixas concentrações por amostra, o ácido nucleico é muito mais puro e, assim, originando resultados mais fidedignos.

A diferença entre os valores de Ct dos ácidos nucleicos concentrados e diluídos para o método B é muito baixa. Uma amostra cujo ácido nucleico foi diluído deveria apresentar um valor de Ct mais elevado do que uma amostra cujo ácido nucleico está concentrado. O facto de a diferença ser muito baixa mostra que as amostras contém bastantes contaminantes.

**Quadro 17: Resultados em Ct das amostras concentradas e diluídas, obtidos pela amplificação do DNA por real-time PCR utilizando o método Christensen e o módulo da sua diferença.**

Amostra	Ct Concentrado	Ct Diluído	Ctconcentrado-Ctdiluido
A1a	27,140	30,095	2,96
A1b	25,720	29,035	3,32
A1c	25,655	29,075	3,42
A1d	26,565	29,575	3,01
A2a	24,675	27,955	3,28
A2b	24,585	27,450	2,87
A2c	25,025	28,250	3,23
A2d	24,425	28,220	3,80
A3a	24,510	27,760	3,25
A3b	24,495	27,960	3,47
A3c	24,340	27,760	3,42
A3d	24,885	28,185	3,30
B1a	27,170	25,930	1,24
B1b	27,515	25,795	1,72
B1c	25,820	26,475	0,66
B1d	25,655	25,395	0,26
B2a	25,205	25,510	0,31
B2b	24,015	25,785	1,77
B2c	25,030	24,970	0,06
B2d	23,635	23,325	0,31
B3a	25,835	24,080	1,76
B3b	24,475	25,370	0,89
B3c	27,735	25,960	1,78
B3d	25,640	26,460	0,82

Através da análise de variâncias, para  $\gamma = 0,05$ , temos os resultados apresentados no quadro 18.

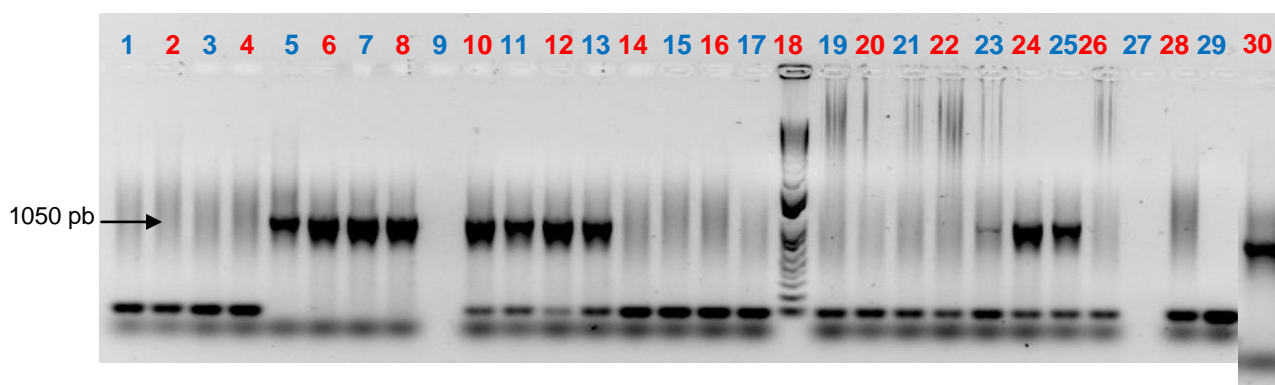
**Quadro 18: Análise de variância a 2 factores, com repetição, para  $\gamma = 0,05$  comparando os valores obtidos na amplificação do DNA por real-time PCR, utilizando o método Christensen**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	valor P	F tabelado
Amostra	0,6161312	2	0,308066	1,226283	0,316754	3,554557
Método	32,051259	1	32,05126	127,5829	1,33E-09	4,413873
Interações	0,4331313	2	0,216566	0,862059	0,43901	3,554557
Dentro	4,5219438	18	0,251219			
Total	37,622466	23				

Somente entre métodos há diferenças significativas dado que o F calculado é superior ao F tabelado.

Observando todas as análises de variância, pode verificar-se que o método PGB é francamente melhor que o CTAB, assegurando melhores resultados.

Seguidamente, na figura 23, apresentam-se os resultados das mesmas amostras em nested-PCR.



**Figura 23: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído da testemunha doente proveniente de macieira infectada.**

1-4: Amostras A1a-A1d; 5-8: A2a-A2d; 9- X; 10-13: A3a-A3d; 14-17: B1a-B1d; 18: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen); 19-22: B2a-B2d; 23-26: B3a-B3d; 27: X; 28, 29: C- Mix; 30: C+ (X = Espaço em branco)

Como se pode verifica, somente algumas subamostras amplificaram. Pode, também, verificar-se a maior obtenção de resultados positivos no método A - PGB, em que se pôde confirmar o que já foi mencionado: o método do PGB, apesar de ser mais moroso, origina ácidos nucleicos mais puros, o que influencia directamente os resultados.

Comparando as amostras que deram resultado negativo com a sua concentração de ácido nucleico, pode deduzir-se que o facto de terem maior ou menor quantidade de ácido nucleico não influencia estes resultados. No "Picogreen", por exemplo, pode-se observar que as amostras A1 e A2 apresentam uma quantidade de ácido nucleico similar e, quando

sujeitas a amplificação por nested-PCR, o conjunto de subamostras A1 (poços 1 a 4) deu negativo enquanto que o conjunto A2 (poços 5 a 8) deu positivo.

Verifica-se neste método a influência dos contaminantes, principalmente no método CTAB.

## IV.2. Resultado das análises ao material vegetal

### IV.2.1. Amostras colhidas em Alcobaça

As amostras de material vegetal provenientes de Alcobaça foram submetidas somente à amplificação por nested-PCR, obtendo-se os resultados observados na figura 24:

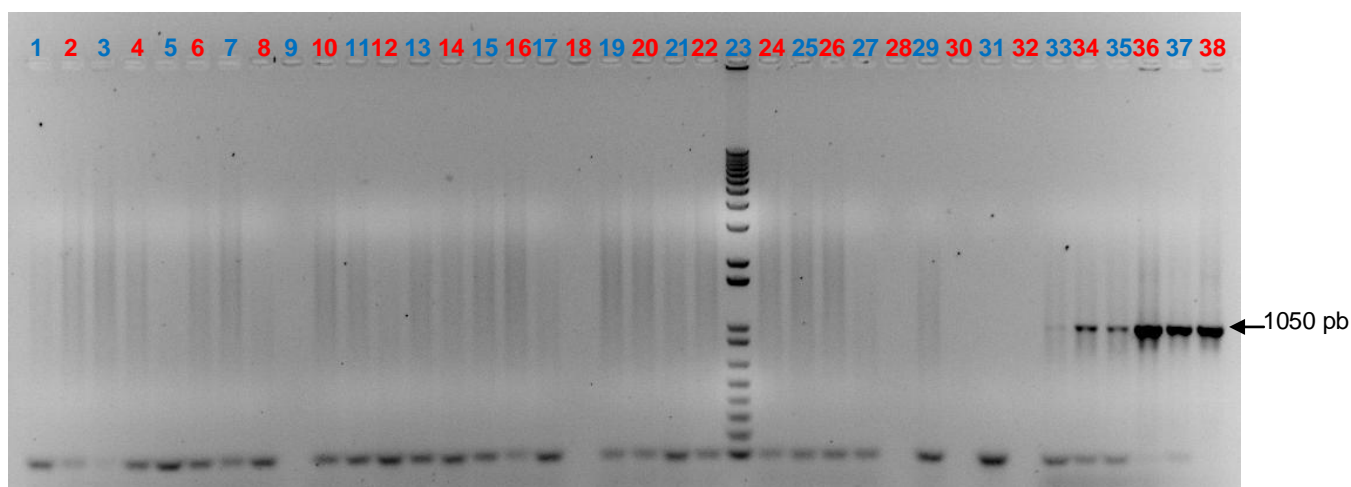


Figura 24: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de várias amostras de material vegetal provenientes de Alcobaça.

1 - Rosácea (C-); 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 19, 20, 22, 25 - Pêra Rocha; 3 - Ameixeira Black Diamond; 5 - Porta-enxerto CMA; 12 - Porta-enxerto OHF 333; 14 - Pessegueiro Rich Lady; 15 - Cerejeira; 16 - Damasqueiro; 17 - Porta-enxerto Colt (de cerejeira); 20 - Não identificada; 21 - Damasqueiro; 23 - Marcador 1kb; 24 - Pêra Carapineira; 26, 27 - Ameixeiras; 29, 31 - C- (Mix1 e 2); 33, 34, 35 - C+ diluídos; 36, 37, 38 - C+ para PD, AP e ESFY.

Como se verifica na figura 24, nenhuma das amostras originou resultados positivos para os fitoplasmas em estudo. Pode-se afirmar que a reacção de amplificação funcionou bem pois os controlos positivos apresentaram bandas bem nítidas, comprovando-se que não ocorreram contaminações durante o processo pela negatividade dos controlos negativos.

Analisando resultados anteriores, estas amostras deveriam ter sido sujeitas a amplificação por real-time PCR mas, por limitação de reagentes quantidade de ácido nucleico, não foi possível. Seria importante saber se houve, ou não, acção dos inibidores na reacção por nested-PCR.

#### IV.2.2. Pesquisa de fitoplasmas nas amostras pertencentes à Colecção Nacional de Fruteiras

Às amostras provenientes do Catálogo Nacional de Fruteiras juntaram-se duas amostras provenientes de dois pomares, Sobrena e Alguber, que, dado que foram extraídas na mesma altura, juntaram-se a esta corrida.

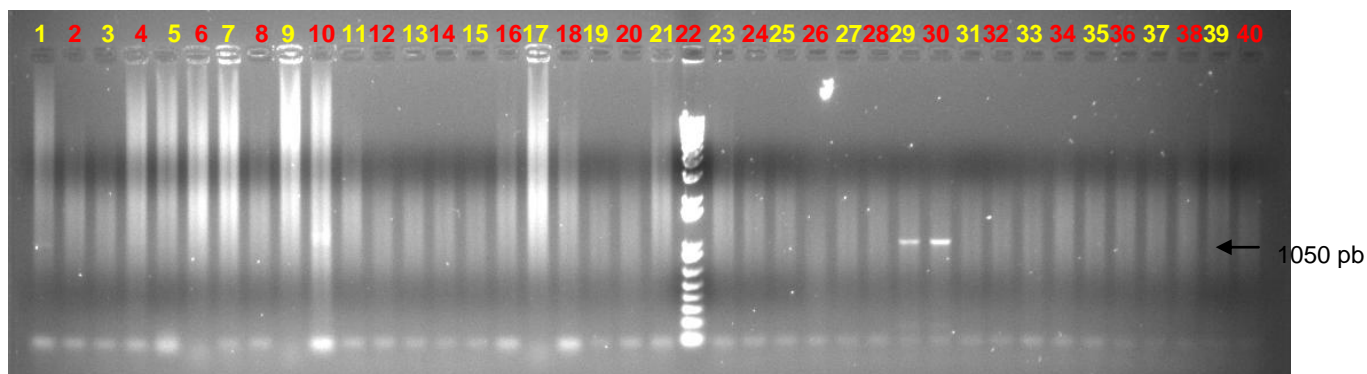


Figura 25: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de amostras provenientes da Colecção Nacional de Fruteiras e de dois pomares abandonados (poços 29 e 30)

1-3: Amostras Malápio da Serra A1-A3; 4-6: Pipo de Basto A1-A3; 7-9: Bravo clone 241 A1-A3; 10-12: Pardo Lindo A1-A3; 13-15 Tromba de Boi A1-A3; 16-18: Pêro Rei A1-A3; 19-21: Piparote A1-A3; 23-25: Pêro de Coura A1-A3; 26-28: Malápio de Ponte; 29: Alguber (Pêra Rocha); 30-31: Sobrena (Pêra Rocha); 32-34: Bravo clone 257 A1-A3; 35-36: Pêra Rocha; 37-39: Focinho de Burro A1-A3; 40: Camoesa Rosa A1; 22: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen)

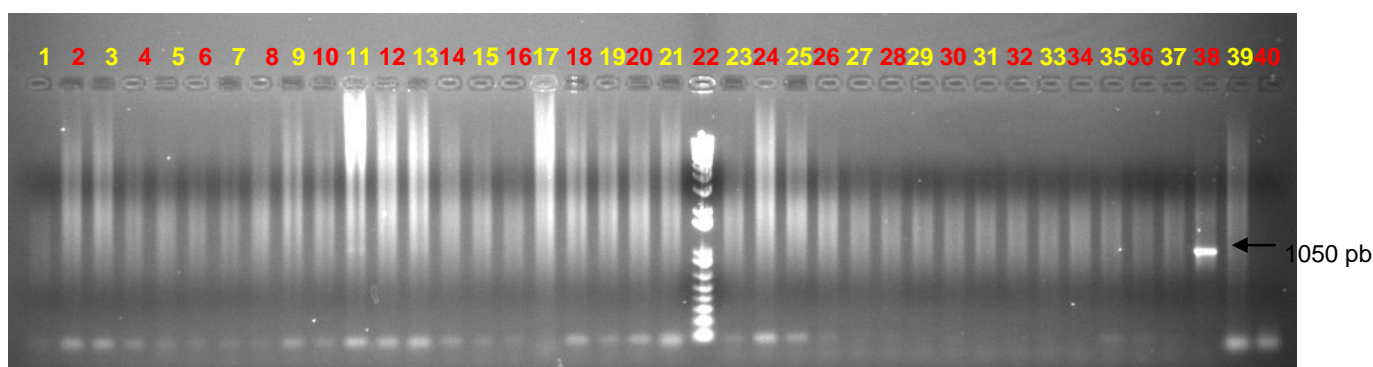


Figura 26: Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de amostras provenientes da Colecção Nacional de Fruteiras

1-2: Camoesa Rosa A2-A3; 3: Marmeleiro (Alcobaça); 4: Carapineira (Alcobaça); 5-6: Bravo clone 065 A1-A2; 7: Carapineira Roxa; 8: Lambe os dedos; 9-11: Bravo clone 219 A1-A3; 12-14: Bravo clone 264 A1-A3; 15-17: Bravo clone 164 A1-A3; 18-20: Bravo clone 042 A1-A3; 21: Malápio do IFEC A1 23-24 Malápio do IFEC A2-A3; 25-27: Durázio A1-A3; 28-30: Bravo clone 226 A1-A3; 31-33: Camoesa Corada A1-A3; 34-36: Comendador A1-A3; 37: Bravo clone 065 A1; 38: C+; 39-40: C- (Mix); 22: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen)

Pelas figuras 25 e 26 pode-se observar a existência de apenas duas amostras positivas, originárias de um pomar de pêra Rocha abandonado. Para confirmação da presença do "*Candidatus*" fitoplasma pyri, o único que se transmite a pereiras, nessas duas



amostras, foi aplicado o método real-time PCR, protocolo NIB (específico para aquele fitoplasma).

Os resultados para o método NIB serão apresentados mais à frente juntamente com os resultados dos insectos dado que foram realizados na mesma corrida.

As amostras da Colecção Nacional de Fruteiras não apresentaram qualquer resultado positivo para os fitoplasmas em estudo.

### IV.3. Resultados da análise aos insectos

#### IV.3.1. Quantificação de insectos por pomar de captura

Analisando o quadro 19, comparando as quantidades de insectos capturados, pode verificar-se a disparidade de valores obtidos. Esta disparidade pode dever-se ao facto de os pomares terem sido tratados recentemente.

**Quadro 19: Quantificação dos insectos por pomar de captura**

Pomar	N.º de Amostras de insectos		
	Machos	Fêmeas	Ninfas
Estação Nacional de Fruticultura Vieira da Natividade	8	2	
	1	2	
Breja	11	33	
Cadaval – Martim Joanes	10	74	
Pero Moniz	31	73	18
Sobrena – Alguber	14	17	
Sobrena – Pomar abandonado	18	16	
Celões – Pomar biológico	3	9	
Cadaval	11	7	
Póvoa	3	5	
Caldas da Rainha – Seixeiro	2	16	
Sub-total	112	254	18
Total	384		

Nem em todos os pomares se teve acesso ao calendário de tratamento mas, pode-se concluir que o tratamento nem sempre é eficaz para controlar a psila da pereira pois esta cria resistência facilmente. No caso do pomar de Pero Moniz, cinco dias anteriores à captura, o agricultor tinha aplicado lixívia e detergente de modo a tentar “limpar” a melada de forma a não perder o valor comercial do fruto e, no início do mês teria aplicado um tratamento de tirame com tiaclopride. Pelas elevadas quantidades de insectos capturados nesse pomar, pode comprovar-se a falta de eficácia do tratamento.

#### IV.3.2. Identificação de *Cacopsylla pyri* (L.)

Por observação à lupa, conseguiram-se diferenciar os machos das fêmeas e, assim, proceder à sua separação (figuras 27 e 28). Conseguiu, também, confirmar-se a espécie através de certos parâmetros específicos. O objectivo da divisão foi unicamente verificar a abundância em género nos pomares.



Figura 27: Macho de *Cacopsylla pyri* (L.)



Figura 28: Fêmea de *Cacopsylla pyri* (L.)

Visualmente, a diferença entre macho e fêmea é bastante óbvia, simplesmente por observação do parâmetro reprodutor (Figuras 27 e 28) (Psyllid Key, 2010). Relativamente ao que identifica a espécie, há dois factores observáveis: a forma de foice do parâmetro masculino e a mancha castanho-amarelada na base das asas. Só a espécie *Cacopsylla pyri* (L.) apresenta estes dois aspectos.

Relativamente às ninfas, não se consegue diferenciar os instares em que se apresentam as ninfas de *Cacopsylla pyri* (L.) capturadas. Nas figuras 29 e 30 poderão observar-se melhor as suas características:



Figura 29: Vários instares ninfais de *Cacopsylla pyri* (L.)



Figura 30: Pormenor de uma das ninfas

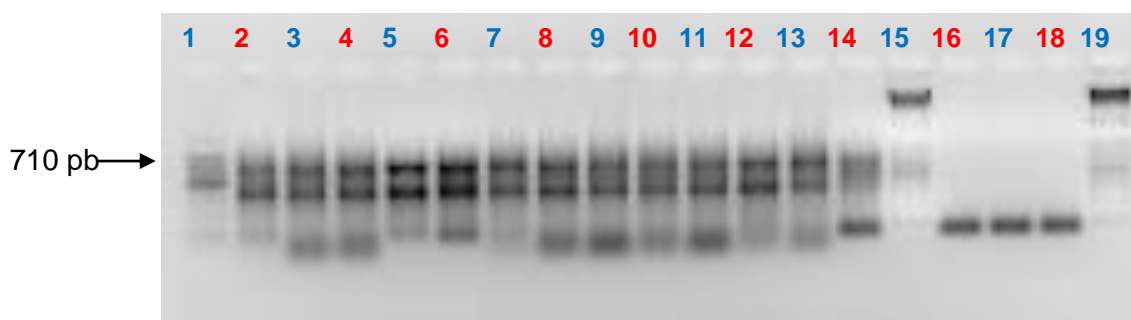


Pelo tamanho das ninfas apresentadas na figura 29, podemos chegar a algumas conclusões do seu instar mas sem certezas. As ninfas maiores poderão pertencer ao 5º instar, enquanto que a ninfa com um aspecto menor e transparente poderá pertencer ao 3º. A mais pequena poderá ser uma muda do 1º instar ninfar (Almeida, 1982).

#### IV.3.3. Análises

Para confirmar a existência de ácido nucleico ampliável de insecto nas amostras, foi realizada uma amplificação por nested-PCR. Assim, a amplificação realizou-se para amostras cuja extracção proviesse de um insecto ou de grupos de dois ou mais (figura 31).

Como em todos os casos, independentemente do número inicial de insectos, se registou a ocorrência de amplificação, inferiu-se que os restantes extractos se encontravam em igual condição para a amplificação.



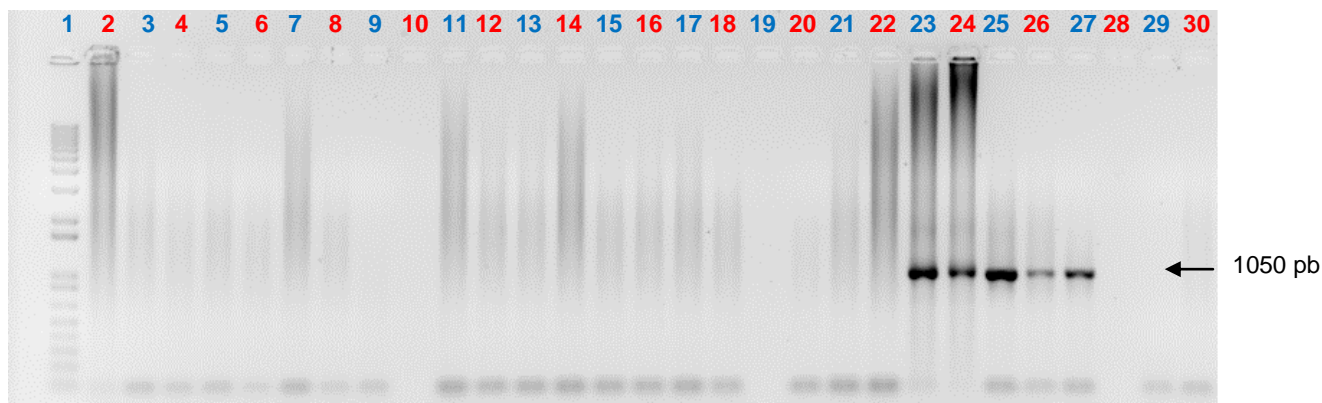
**Figura 31:** Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção da subunidade I do gene mitocondrial da citocromo c oxidase, fragmento de cerca de 710 pb da por amplificação de um fragmento de 710pb por PCR convencional, utilizando os primers LCO1490 - HC02198 a partir do DNA extraído de amostras de insectos capturados na zona oeste.

1: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen); 2: F1c (4 insectos); 3: M1a (2); 4: Fc9 (5); 5: ENF M (1); 6: PovM (3); 7: CadF1 (4); 8: ENF F (2); 9: Alg M1 (7); 10: PMN; 11: F2d (2); 12: M2b (1); 13: Sob F3 (6); 14: PM M6 (2); 15: C+ Larva de *Drosophila*; 16: C- Planta; 17, 18: C- Água; 19: Marcador molecular

Relativamente às análises biomoleculares dos insectos capturados, serão apresentados os resultados por ordem da data de extracção do ácido nucleico.

Começando pelos insectos cujo ácido nucleico foi extraído a 27 e 28 de Maio, obtiveram-se os resultados apresentados na figura 32.

Como se pode verificar, pela inexistência de banda a 1050 pb, não há psilas positivas para os fitoplasmas em estudo.

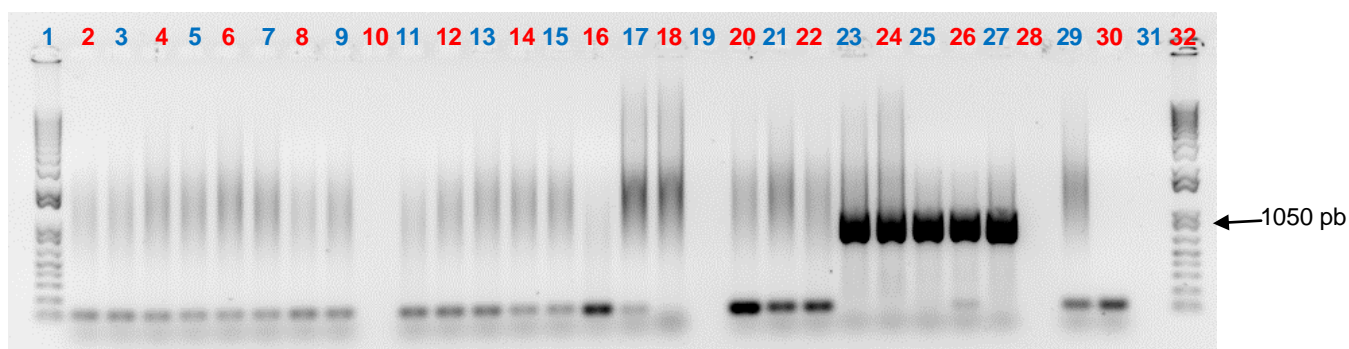


**Figura 32:** Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste

1: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen); 2-9: F1a-F1h; 10: X; 11-15: M1a-M1e; 16-18: F2a-F2c; 19: X; 20: F2d; 21-22: M2a-M2b; 23-27: C+ PD, PD diluído 1:10, AP, AP diluído 1:10, e ESFY; 28: X; 29-30: C- (Mix das 2 reacções do Nested-PCR)

Na figura 33, analisaram-se as psilas capturadas em Martim Joanes durante o mês de Junho, cujo ácido nucleico também fora extraído em Junho.

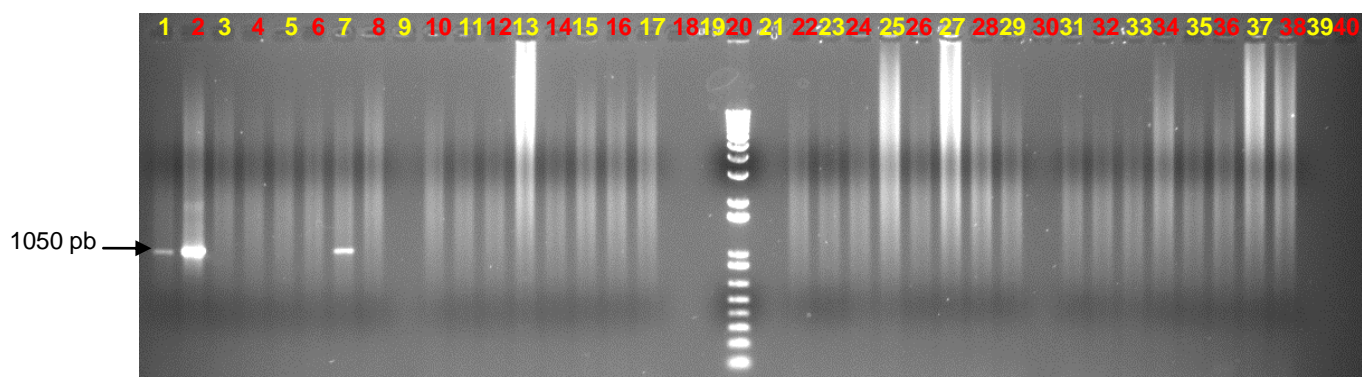
Como se pode observar, tal como aconteceu na análise anterior, não há insectos positivos para os fitoplasmas em questão.



**Figura 33:** Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste (Martim Joanes)

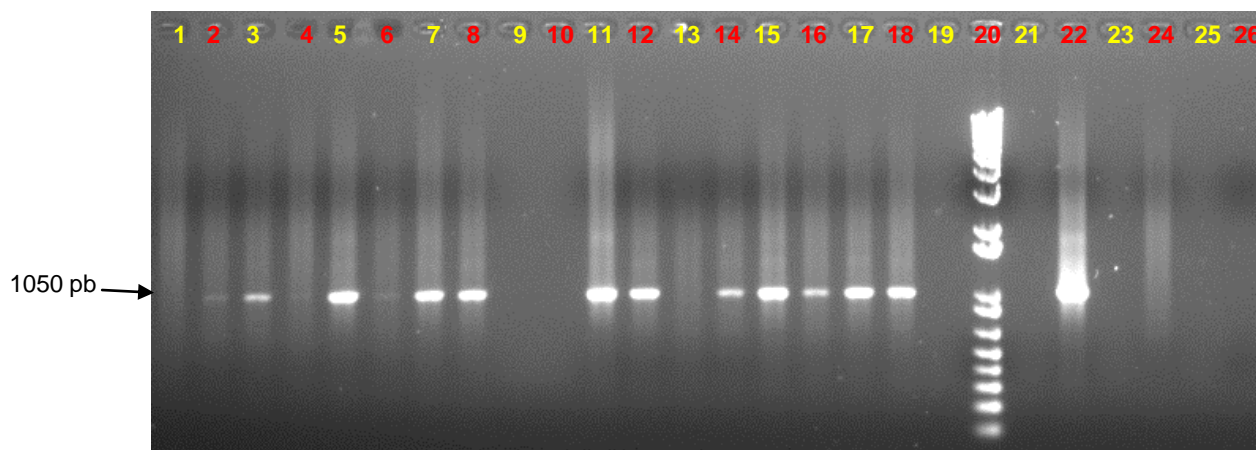
1: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen); 2-9: Fc1-Fc8; 10: X; 11-18: Fc9-Fc15; 19: X; 20-22: Mc1-Mc3; 23-27: C+ PD, PD diluído 1:10, AP, AP diluído 1:10, e ESFY; 28: X; 29-30: C- (Mix para os 2 processos do Nested-PCR); 31: X; 32: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen)

Por fim, foram analisados os insectos cujo ácido nucleico foi extraído a 27 e 28 de Julho (figuras 34 e 35).



**Figura 34:** Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste.

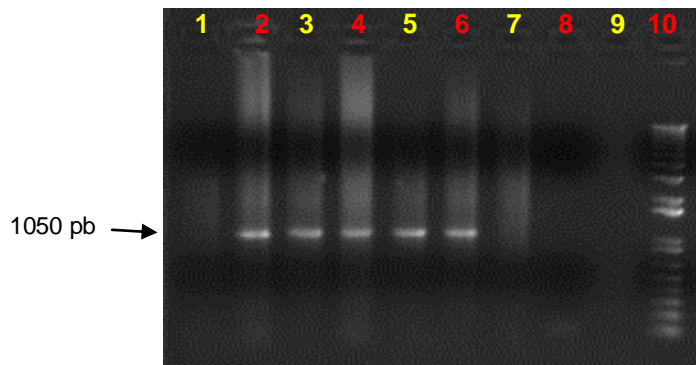
1: PM N; 2-8: PM F1-F7; 9: X; 10-17: PM F8-F15; 18-19: X; 20: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen); 21: X; 22-27: PM M1-M6; 28: ENF F; 29: ENF M; 30: X; 31-32: Cel F1-F2, 33: Cel M; 34: Pov F; 35: Pov M; 36-38: Cald F1-F3



**Figura 35:** Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste.

1: Cald M; 2-4: Sob F1-F3; 5-7: Sob M1-M3; 8: Alg F1; 9-10: X; 11-12: Alg F2-F3; 13-14: Alg M1-M2; 15-16: Cad F1-F2; 17-18: Cad M1-M2; 19: X; 20: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen); 21: X; 22: C+; 23: X; 24: C- (mix 1); 25: X; 26: C- (Mix 2)

Pode verificar-se, nas figuras 34 e 35 a existência de 16 amostras positivas. Por se tratar de um organismo de quarentena, pela primeira vez detectado no país, considerou-se importante reproduzir o nested-PCR de forma a confirmar-se a inexistência de qualquer tipo de contaminação durante o procedimento. A amplificação por nested-PCR foi realizada nas mesmas condições que a amplificação anterior, para algumas das amostras positivas que apresentavam uma banda mais forte, onde se compararam com os resultados obtidos anteriormente (figura 36):



**Figura 36:** Electroforese em gel de agarose a 1% em TAE relativo à detecção de fitoplasmas do grupo AP por amplificação de um fragmento de 1050 pb por nested-PCR, utilizando os primers f01-r01 a partir do DNA extraído de insectos capturados na zona Oeste. (repetição de amostras positivas, obtidas no PCR anterior (figuras 34 e 35) )

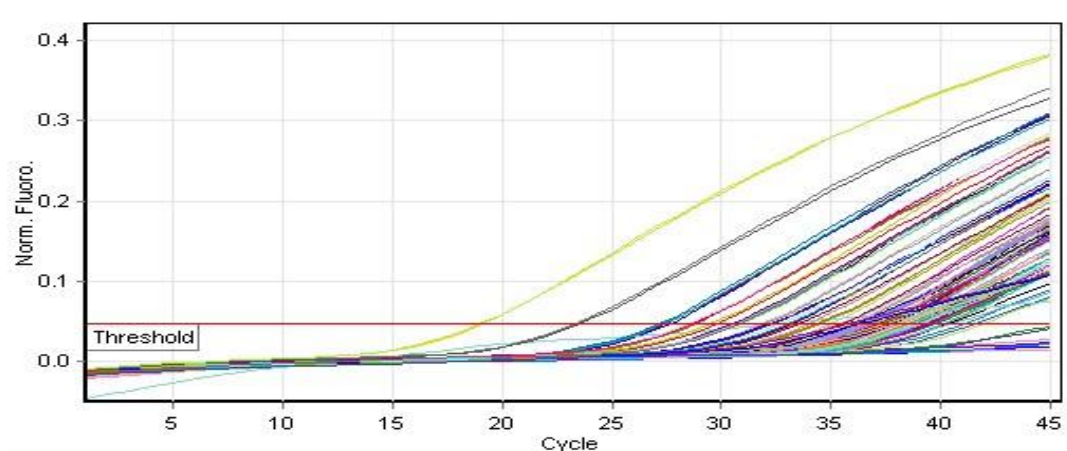
1- PM N; 2: PM F1; 3: Sob M1; 4: Alg F2; 5: Cad F1; 6: C+; 7-8: C- (Mix 1 e 2)

Pela figura 36 pode-se observar que, exceptuando o PM N, todas as amostras confirmam a sua positividade.

Dado que as concentrações de ácido nucleico dos insectos eram bastante baixas, põe-se a questão: os resultados negativos, inexistência de banda na electroforese, ocorrem por a amostra em causa estar negativa ou por não haver ácido nucleico suficiente para se dar a reacção?

Segundo Garcia-Chapa *et al.* (2003) a difusão do fitoplasma na árvore, por não ser constante, dificulta o diagnóstico. Também o órgão colhido para teste poderia não estar infectado pois a presença do fitoplasma varia no interior da árvore.

Às amostras de psilas reveladas como positivas para os fitoplasmas em estudo foi aplicado o método real-time PCR, protocolo “Christensen” (figura 37), um método não específico, detectando qualquer fitoplasma do grupo 16 SrX, com o objectivo de comparar, relativamente ao nested-PCR, os resultados obtidos.



**Figura 37:** Curvas de fluorescência que ilustram a amplificação do DNA de alguns insectos, em tempo-real pelo método Christensen. A fluorescência registada para cada amostra é aquela que atinge um limiar de detecção (linha horizontal a vermelho) por convenção denominado de Ct.

Na figura 37 consegue ver-se claramente a homogeneidade de alguns duplicados e, também, as amostras com amplificação tardia. A linha “threshold” deveria ter sido colocada um pouco mais abaixo mas, de forma a excluir algumas das amostras de amplificação mais tardia, fixou-se o valor em, aproximadamente, 0,05. As amostras negativas situaram-se muito abaixo da linha “threshold”.

No quadro 20 encontram-se descritos os valores de Ct:

**Quadro 20: Resultados em Ct das amostras concentradas, obtidos pela amplificação do DNA de insectos por real-time PCR, utilizando o método “Christensen”**

Nome	Tipo	Ct	Nome	Tipo	Ct	Nome	Tipo	Ct	
PM N	Unknown	39,51	PM M3	Unknown		Sob M1	Unknown	27,37	
		40,29						27,17	
PM F1	Unknown	27,62	PM M4	Unknown	41,53	Sob M2	Unknown	36,4	
		27,45			38,29			35,77	
PM F2	Unknown		PM M5	Unknown		Sob M3	Unknown	28,68	
		41,11			39,46			28,58	
PM F3	Unknown	36,83	PM M6	Unknown	40,4	Alg F1	Unknown	31,9	
		37,7			40,11			32,02	
PM F4	Unknown	35,57	ENF F	Unknown	41,95	Alg F2	Unknown	23,32	
		35,58			39,53			23,55	
PM F5	Unknown	36,77	ENF M C	Unknown	32,76	Alg F3	Unknown	29,81	
		36,67	ENF M	Unknown	38,63			29,58	
PM F6	Unknown	34,97	Cel F1	Unknown	37,11	Alg M1	Unknown	32,23	
		34,55			36,28			32,32	
PM F7	Unknown	38,02	Cel F2	Unknown	35,43	Alg M2	Unknown	33,29	
		36,54			35,49			33,18	
PM F8	Unknown	38,1	Cel M	Unknown	39,63	Cad F1	Unknown	28,79	
		38,24			38,5			28,76	
PM F9	Unknown	36,82	Pov F	Unknown	39,14	Cad F2	Unknown	32,67	
		38,61			39,78			33,06	
PM F10	Unknown	37,78	Pov M	Unknown	36,21	Cad M1	Unknown	30,75	
		37,39			37,22			30,49	
PM F11	Unknown	38,89	Cald F1	Unknown	39,55	Cad M2	Unknown	30,8	
					38,41			30,61	
PM F12	Unknown	37,8	Cald F2	Unknown	38,9	C+	Pos. Control	19,14	
		39,28			39,16			19,01	
PM F13	Unknown	40,18	Cald F3	Unknown	37,92	C-	NTC		
		38,65			37,52				
PM F14	Unknown	35,92	Cald M1	Unknown	39,1				
		36,06			40,57				
PM F15	Unknown	37,15	Sob F1	Unknown	36,78				
		37,2			36,69				
PM M1	Unknown	37,53	Sob F2	Unknown	33,98				
		36,98			33,54				
PM M2	Unknown		Sob F3	Unknown	34,4				
					34,53				

Como se pode verificar, analisando o quadro acima, ocorreram amplificações na maioria das amostras significando que um dos fitoplasmas do grupo AP estava presente nas amostras testadas. As duas amostras que não amplificaram, PM M2 e PM M3 foram claramente negativas. Existem algumas dúvidas sobre a positividade de outras - PM F2, PM F11, PM M5 – pois os valores dos duplicados não são conclusivos, devido à ausência de amplificação de um deles, provavelmente devido a erros de pipetagem.

Outro aspecto a ter em causa são os valores elevados de Ct. Há estudos que permitem determinar a partir de que ponto uma amostra pode ser considerada negativa, comparando o ciclo em que amplifica e o número total de ciclos do programa, neste caso 45 ciclos – Regra do Cut-off.

Segundo Chandelier *et al.* (2010), para um programa com 40 ciclos, a partir do ciclo 34,39 as amostras poderiam ser consideradas negativas para o patógeno por eles pesquisado. Para realizar este estudo, ter-se-ia que ser realizado um protocolo que envolveria a realização de numerosas reacções de real-time PCR, pelo que se poderá apenas estipular um valor a partir do qual estas amostras são negativas.

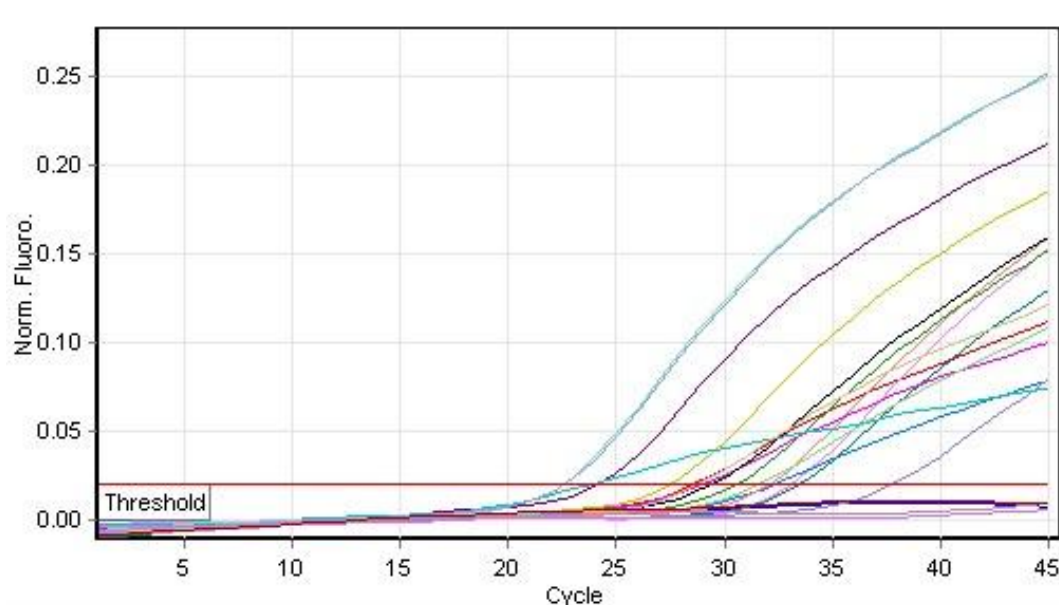
Dado que o total do programa é de 45 ciclos, poderá dizer-se que, a partir do ciclo 38-39, as amostras poderão ser consideradas negativas. Seguindo esta regra, o número de amostras negativas aumenta, estando estas assinaladas a vermelho no quadro acima. A amostra ENF M C é uma amostra contaminada pelo operador, contendo este ácido nucleico pertencente a duas amostras diferentes, pelo que foi excluída da análise gráfica.

Comparando estes resultados com os obtidos através de nested-PCR, pode confirmar-se que existiu uma contaminação na primeira amplificação da amostra PM N dado que, quer na amplificação de confirmação, quer em Real-time, o resultado foi negativo. Em todas as outras amostras houve correspondência entre os resultados positivos obtidos pelos diversos protocolos. Devido à maior sensibilidade do método, algumas amostras negativas por nested-PCR deram resultados positivos em Real-time.

Como só foram capturadas *Cacopsylla pyri* (L.), o único fitoplasma com que poderiam estar infectadas seria o *Candidatus* fitoplasma pyri, pelo que foi realizado o método NIB, específico para este fitoplasma, para confirmação da presença do mesmo.

Nem todas as amostras foram testadas pelo protocolo NIB devido à escassez de reagentes e ácido nucleico não tendo sido feitos duplicados e nem todas as amostras positivas foram sujeitas ao teste. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 38.





**Figura 38:** Curvas de fluorescência que ilustram a amplificação do DNA de alguns insectos, em tempo-real pelo método NIB. A fluorescência registada para cada amostra é aquela que atinge um limiar de detecção (linha horizontal a vermelho) por convenção denominado de Ct.

Podem observar-se, na figura 38, os controlos negativos, assim como a amostra PM N, que não amplificaram, abaixo da linha do limiar. Como os valores de Ct obtidos não se aproximam da totalidade de ciclos do programa, não foi necessário aplicar a regra do Cut-off.

Como se pode observar no quadro 21, voltou-se a confirmar a negatividade da amostra PM N, ou seja, as ninfas não estavam infectadas com o fitoplasma, contrariamente às restantes amostras pois todas amplificaram, em ciclos não muito altos, como era esperado. As amostras 28 e 29 correspondem às amostras de material vegetal dos pomares da Sobrena e Alguber, mencionadas em 4.2.2..

**Quadro 21:** Resultados em Ct das amostras concentradas, obtidos pela amplificação do DNA de insectos por real-time PCR, utilizando o método NIB

Nome	Tipo	Ct	Nome	Tipo	Ct
28	Unknown	28.61	ALG F1	Unknown	29.50
29	Unknown	27.53	ALG F2	Unknown	23.89
PM N	Unknown		ALG F3	Unknown	28.82
PM F1	Unknown	24.24	ALG M2	Unknown	31.71
PM F6	Unknown	33.15	C+	Controlo positivo	22.56
SOB F2	Unknown	32.43			22.65
SOB F3	Unknown	33.54	C- sala DNA	NTC	
SOB M2	Unknown	32.15	C- Sala Mix	NTC	
CAD F2	Unknown	30.64	C- Sala Mix	NTC	
CAD M1	Unknown	29.05			

#### IV.4. Sequenciação

O produto nested-PCR obtido da amostra PMF2 foi enviado para sequenciação nucleotídica nos dois sentidos, isto é, com ambos os iniciadores, f01 e r01, obtendo-se assim a sequência "consensus", que foi introduzida posteriormente no programa BLASTn-NCBI para comparação com as sequências existentes na base de dados, confirmando tratar-se do "*Candidatus*" fitoplasma pyri.

No quadro 22, podem observar-se quatro das sequências encontradas no GenBank que alinharam com a sequência em estudo apresentando graus de identidade de 99%, cobertura de 100% e com um valor de E igual a zero, obtendo-se assim um alinhamento quase perfeito entre as mesmas.

**Quadro 22: Resultados do alinhamento da sequência "consensus" obtida com sequências integrantes da base de dados GenBank**

Código de Acesso	Descrição	Cobertura	E value	Max ident
AJ542543.1	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri 16SrRNA gene, tRNA-Ile gene and 23SrRNA gene (partial), strain PD1. <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri 16SrRNA gene	100%	0.0	99%
AJ964959.1	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri 16SrRNA gene, 16S-23S IGS, partial 23SrRNA gene and tRNA-Ile gene, isolate 973PD. <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri 16SrRNA gene	100%	0.0	99%
Y16392.1	Pear decline phytoplasma 16SrRNA gene	100%	0.0	99%
AF319552.1	Pear decline phytoplasma isolate PDE19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100%	0.0	99%

Apresenta-se de seguida, a exemplo, o alinhamento da sequência consensos com a sequência existente no GenBank com o número de acesso AJ964959.1.

*Candidatus* Phytoplasma pyri 16SrRNA gene, 16S-23S IGS, partial  
23S rRNA gene and tRNA-Ile gene, isolate 973PD  
Length=1784  
Score = 1770 bits (958), Expect = 0.0  
Identities = 960/961 (99%), Gaps = 0/961 (0%)  
Strand=Plus/Plus



Query	1	AGACGAGGATAACAGTTGGAACCGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTT	60
Sbjct	119	AGACGAGGATAACAGTTGGAACCGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTT	178
Query	61	GAAACTTTTAAAGACCCGCAAGGGTATGCTGAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAG	120
Sbjct	179	GAAACTTTTAAAGACCCGCAAGGGTATGCTGAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAG	238
Query	121	TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACCATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC	180
Sbjct	239	TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACCATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGC	298
Query	181	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG	240
Sbjct	299	CACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG	358
Query	241	CAATGGAGGAAACTCTGACCAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTAGGTATGTAA	300
Sbjct	359	CAATGGAGGAAACTCTGACCAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTAGGTATGTAA	418
Query	301	AGTTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAAT	360
Sbjct	419	AGTTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAAT	478
Query	361	AAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCG	420
Sbjct	479	AAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCG	538
Query	421	GATTTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCAACG	480
Sbjct	539	GATTTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCAACG	598
Query	481	CTTAACGTTGTGATGCTATAGAAACTGTTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGAATT	540
Sbjct	599	CTTAACGTTGTGATGCTATAGAAACTGTTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGAATT	658
Query	541	CCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTG	600
Sbjct	659	CCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTG	718
Query	601	CTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	660
Sbjct	719	CTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	778
Query	661	GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGCTGAAGTTAA	720
Sbjct	779	GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGCTGAAGTTAA	838
Query	721	CGCATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACG	780
Sbjct	839	CGCATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACG	898
Query	781	GGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAACCTTACC	840
Sbjct	899	GGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAACCTTACC	958
Query	841	AGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGT	900
Sbjct	959	AGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGT	1018
Query	901	GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC	960
Sbjct	1019	GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC	1078

#### IV.5. RFLP

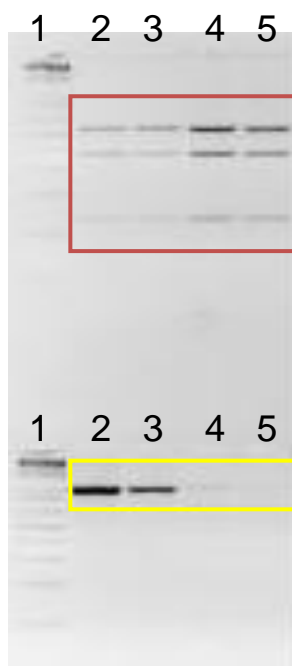
Os resultados obtidos em RFLP, com as enzimas *Sspl* e *Sfcl* confirmam, como todos os métodos já utilizados, que as amostras se encontravam infectadas com o fitoplasma "*Candidatus*" fitoplasma pyri, dado que o produto PCR foi digerido nos locais obtidos através do "site" NEBCutter.

Introduzindo a sequência obtida com os iniciadores f01-r01, puderam verificar-se os locais onde as enzimas *Sspl* e *Sfcl* cortam a sequência, como observável quadro 23.

**Quadro 23:** Locais de corte da sequência "*consensus*", obtida com os iniciadores f01-r01, pelas enzimas *Sspl* e *Sfcl*

Enzima	Local de corte
<i>Sspl</i>	961
<i>Sfcl</i>	496
	368
	97

O gel de agarose obtido após digestão do produto de PCR de três amostras positivas obtido com os iniciadores f01-r01, por ambas as enzimas, apresenta o padrão electroforético representado pela figura 39. Confirma-se que as amostras analisadas estão infectadas com PD pois todas apresentam os cortes referidos no quadro 23.

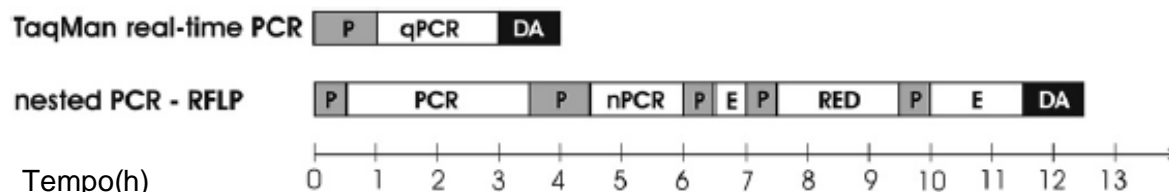


**Figura 39:** Padrão electroforético da digestão do produto PCR obtido com os iniciadores f01-r01, de três amostras positivas, utilizando as enzimas de restrição *Sfcl* (a vermelho) e *Sspl* (a amarelo)

1: Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen); 2: Amostra PM F2; 3: Amostra 29; 4: Amostra Sob M1; 5: C+ PD

#### IV.6. Análise de custos

Na figura 40 pode observar-se o tempo necessário para chegar ao diagnóstico final, utilizando os métodos nested-PCR ou real-time PCR.



**Figura 40:** Comparação de tempo utilizado para chegar ao diagnóstico final em nested-PCR e em real-time PCR. P: Tempo para manipulação das amostras – diluições, encher tubos de reacção; qPCR: real-time PCR; DA: análise de dados obtidos; nPCR: nested-PCR; E: electroforese; RED: RFLP (Fonte: Nicolíć *et al.*, 2010)

Tendo conhecimento dos encargos institucionais (remuneração de um técnico superior, no nosso país) e do tempo que é necessário para chegar ao diagnóstico final em nested-PCR e real-time PCR, efectuou-se uma análise de custos com o objectivo de comparar os métodos. Os valores obtidos encontram-se no quadro 24.

**Quadro 24:** Custos totais, até alcançar o diagnóstico final, para uma reacção de real-time PCR e uma reacção de nested-PCR

Real-time PCR (100 reacções/4 horas)			Nested-PCR (96 reacções/13 horas)		
Custos (€)			Custos (€)		
Reagentes	Consumíveis	Remunerações	Reagentes	Consumíveis	Remunerações
31,04	15,49	42,83	7,87	9,85	139,19

Analisando o quadro 24, verifica-se que é substancialmente mais elevado o custo de um diagnóstico por nested-PCR. É por ser um método mais moroso que o ser valor acresce, dado que os custos associados a reagentes e consumíveis é mais baixo, quando comparado com o real-time PCR. Para chegar ao diagnóstico final, para 96 reacções, em nested-PCR são necessários, no mínimo, dois dias de trabalho enquanto que, para o real-time PCR, para 100 reacções, meio dia de trabalho é suficiente.

## V. Conclusões

Através de métodos biomoleculares, nested-PCR e real-time PCR, foi confirmada, pela primeira vez, a presença do fitoplasma “*Candidatus*” phytoplasma pyri (PD) em Portugal, tanto no vector, como no hospedeiro (duas amostras de pereira cv.Rocha e catorze amostras de *Cacopsylla pyri* (L.)).

Tratando-se de organismos de quarentena, medidas de controlo adicionais terão de ser definidas pelos serviços oficiais responsáveis.

O facto de os pomares visitados não apresentarem sintomas, não significa que as árvores não estejam afectadas. Uma das lacunas do trabalho foi não se ter conseguido testar material vegetal de todos os pomares onde foram capturados insectos.

Relativamente ao AP e ESFY, o facto de não estarem presentes, pelo menos nos pomares visitados, os seus vectores, leva a crer que esses pomares ainda não se encontrem infectados, com grande probabilidade de não ocorrência destas doenças nas fruteiras nacionais.

Apesar de ambos os métodos se terem apresentado eficazes para a detecção dos fitoplasmas em estudo, o real-time PCR demonstrou ser mais sensível, visto ter detectado amostras positivas, não detectadas por nested-PCR.

A título demonstrativo observou-se que, até chegar ao diagnóstico final, através de real-time PCR, são necessárias quatro horas, enquanto que, para nested-PCR são necessárias, no mínimo oito (caso não seja necessário realizar RFLP).

A elevada sensibilidade e fácil manuseamento fazem com que o real-time PCR seja o método de eleição para o estudo de interacções entre o fitoplasma e a planta hospedeira. O nested-PCR apresenta a desvantagem de ser altamente influenciável pelos contaminantes que possam estar presentes no ácido nucleico extraído.

Confirmou-se que os resultados do nested-PCR e real-time PCR são afectados pela qualidade dos ácidos nucleicos extraídos, tendo-se verificado que o designado método A – PGB/CTAB utilizado se mostrou mais eficaz que o método B - CTAB.

Com vista a uma estratégia integrada no controlo de doenças provocadas por fitoplasmas, torna-se necessário um maior desenvolvimento dos métodos de diagnóstico, em particular, na área da biologia molecular, como o nested-PCR e o real-time PCR. A detecção precoce dos fitoplasmas associados a graves doenças das culturas, assim como o estudo das relações fitoplasma-vector-hospedeiro exige técnicas sensíveis, robustas e rápidas na obtenção dos resultados.

A ocorrência deste fitoplasma de quarentena, “*Candidatus*” fitoplasma pyri, em pomares de pereiras na região de maior produção da pereira cv.Rocha deverá ser futuramente seguida através de prospecções anuais e controlo dos vectores.

## VI. Bibliografia

Agrosciences, D. *Cacopsylla pyri Situación actual*.

Ahn, S. J., Costa, J., & Emanuel, J. R. (1996). PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research* vol.24 , pp. 2623–2625.

Aldaghi, M., Massart, S., Dutreq, O., Bertaccini, A., Jijakli, M., & Lepoivre, P. (2009). A simple and rapid protocol of crude DNA extraction from apple trees for PCR and real-time PCR detection of 'Candidatus Phytoplasma mali'. *Journal of Virological Methods* 156 , pp. 96-101.

Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., & Arzone, A. (1997). Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* , pp. 115-121.

Almeida, M. J. (1982). *Contribuição para o conhecimento de Psilas da Pereira*. Lisboa.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Molecular Biology Journal*, 215 , pp. 403-410.

Avinent, L., Llácer, G., Almacellas, J., & Torá, R. (1997). Pear decline in Spain. *Plant Pathology* , pp. 694-698.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso, R. A., Shevchenko, D. V., et al. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188 , pp. 3682-3696.

Batiste, W. C., & Bulla, A. D. (1980). *Establishment, spread and current distribution of pear psylla in Western Colorado*. *Colorado State University Experiment Station Progress Report 11*. Fort Collins, CO.

Belien, T. (2010). Optimal control strategies of phytoplasma vectors: an overview of efficacy results of (low-impact) insecticides and alternative products against pear psylla . *COST FA0807, WG3*, (p. 18).

Boudon-Padieu, E., Larrue, J., & Caudwell, A. (1989). ELISA and Dot-blot detection of Flavescence dorée MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Current Microbiology*, 19 , pp. 357-364.

Carraro, L., Loi, N., & Ermacora, P. (2001). The "Life Cycle" of Pear Decline Phytoplasma in the vector *Cacopsylla pyri*. *Journal of Plant Pathology* 83 , pp. 87-90.

Chandelier, A., Planchon, V., & Ogen, R. (2010). Determination of cycle cut off in real-time PCR for the detection of regulated plant pathogens. *Bulletin OEPP/EPPO, Bulletin 40* , pp. 52-58.

Chang, C. J. (1998). Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. *Phytopathology*, 88 , pp. 1347-1350.

Chen, K. H., Credi, R. C., Loi, N., Maixner, M., & Chen, T. A. (1994). Identification and grouping of mycoplasma-like organisms associated with grapevine yellows and clover phyllody diseases based on immunological and molecular analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 , pp. 1905-1913.

Chiykowski, L. N. (1991). Vecto-pathogen-host plant relationships of clover phyllody mycoplasma-like organism and the vector leafhopper *Paraphlepsius irroratus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13 , pp. 11-18.

- Choi, Y. H., Tapias, E. C., Kim, H. K., Lefeber, A. W., Erkelens, C., Verhoeven, J., et al. (2004). Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology*, 135, pp. 1398-1410.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., & Schulz, A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, pp. 1875-1884.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., & Schulz, A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *The American Phytopathological Society*, pp. 1175-1184.
- Condon, C., Philips, J., Fu, A., Squires, C., & Squires, C. L. (1992). Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, 11, pp. 4175-4185.
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. A., & Oropeza, C. (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology*, 4, pp. 99-108.
- D'Arcy, C. J., & Nault, L. R. (1982). Insect transmission of plant viruses and mycoplasma-like and rickettsial-like organisms. *Plant Disease*, 66, pp. 99-104.
- Doi, Y., Terenaka, M., Yora, K., & Asuyama, H. (1967). Mycoplasma of PTL group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Pawlonia witches' broom. *Annals of The Phytopathological Society of Japan*, 33, pp. 259-266.
- EPPO/CABI. (1996). Pear Decline Phytoplasma. *Data Sheets on Quarantine Pests*.
- Firrao, G., Andersen, M., Bertaccini, A., Boudon, E., Bove, J. M., Daire, X., et al. (2004). 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, pp. 1243-55.
- Fletcher, J., Wayadande, A., Melcher, U., & Ye, F. (1998). The pathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. *Phytopathology*, 88, pp. 1351-1358.
- Galetto, L., & Marzachi, C. (2010). Real-time PCR Diagnosis and Quantification of phytoplasmas. In Phyllis, P. G. Weintraub, & P. Jones, *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (pp. 1-18).
- Garcia-Chapa, M., Battle, A., Rekab, D., Rosquete, M. R., & Firrao, G. (2004). PCR-mediated whole genome amplification of phytoplasmas. *Journal of Microbiological Methods* 56, pp. 231-242.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M. A., Laviña, A., & Batlle, A. (2003). Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology* 52, pp. 513-520.
- Golino, D. A., Oldfield, G. N., & Gumpf, D. J. (1989). Experimental hosts of the beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Plant Disease*, 73, pp. 850-854.
- Gundersen, D. E., & Lee, I. -M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35, pp. 114-151.
- Gutell, R. R., Larsen, N., & Woese, C. R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiology Rev.*, 58, pp. 10-26.

- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., & Dickinson, M. (2009). Panel of 23S rRNA Gene-Based Real-Time PCR Assays for Improved Universal and Group-Specific Detection of Phytoplasmas. *Applied Environmental Microbiology*, pp. 2945-2950.
- Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., & Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9, pp. 403-423.
- Hoy, C. W., Heady, S. E., & Koch, T. A. (1992). Species composition, phenology, and possible origins of leafhoppers (Cicadellidae) in Ohio vegetable crops. *Journal of Economic Entomology*, 85, pp. 2336-2343.
- INE. (2011). *Recenseamento Agrícola 2009 - Análise dos principais resultados*. Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- Jarausch, W., Fuchs, A., & Jarausch, B. (2010). Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the specific quantification of *Candidatus phytoplasma prunorum* in plants and insects. *21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*, (pp. 392-394).
- Jarausch, W., Lansac, M., & Dosba, F. (1999). Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology*, 147, pp. 47-54.
- Jaraush, B., Fuchs, A., Schwind, N., Krczal, G., & Jaraush, W. (2007). *Cacopsylla picta* as most important vector for *Candidatus phytoplasma mali* in Germany and neighbouring regions. *Bulletin of Insectology* 60, pp. 189-190.
- Jaraush, W., Saillard, C., Broquaire, J. M., Garnier, M., & Dosba, F. (2000). PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various *Prunus* species. *Molecular and Cellular Probes* 14, pp. 171-179.
- Khalifa, M. B., Marrakchi, M., & Fakhfakh, H. (2007). *Candidatus phytoplasma pyri* infections in pear orchards in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 89, pp. 269-272.
- Kirkpatrick, B. C., & Kuske, C. R. (1992). Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, pp. 226-233.
- Kirkpatrick, B. C., & Neimark, H. (1993). Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic Mycoplasma-like organisms. *Molecular Microbiology*, pp. 21-28.
- Kollar, A., & Seemüller, E. (1989). Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology* 127, pp. 177-196.
- Križanac, I., Mikec, Ž., Budinščak, M., Šeruga, M., & D., Š. (2010). Diversity of Phytoplasmas Infecting Fruit Trees and Their Vectors in Croatia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117, pp. 206-213.
- Lauer, U., & Seemüller, E. (2000). Physical map of the chromosome of the apple proliferation phytoplasma. *Journal of Bacteriology*, 182, pp. 1415-1418.
- Lee, I. -M., Davis, R. E., & Gundersen-Rindal, D. E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54, pp. 221-255.

Lee, I. M., Davis, R. E., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Fletcher, J., Hiruki, C., et al. (1992). A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology*, 82, pp. 977-986.

Lee, I. -M., Gundersen, D. E., Hammond, R. W., & Davis, R. E. (1994). Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84, pp. 559-566.

Lee, I. -M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., & Bartoszyk, I. M. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, pp. 1153-1169.

Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Osler, R., & Chen, T. A. (2002). Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Pathology*, 108, pp. 81-86.

Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., & Seemüller, E. (1995). Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85, pp. 771-776.

Lorenz, K. -H., Schneider, B., Ahrens, U., & Seemüller, E. (1996). Detection of Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR Amplification of Ribosomal and Nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, pp. 771-776.

Milne, R. G., Ramasso, E., Lenzi, R., Masenga, V., Sarindu, S., & Clark, M. F. (1995). Pre- and Post-embedding immunogold labeling and electron microscopy in plant host tissues of three antigenically unrelated MLOs: primula yellows, tomato big and bermudagrass whiteleaf. *Journal of Plant Pathology*, 101, pp. 57-67.

Morton, A., Davis, D. L., Blomquist, C. L., & Barbara, D. J. (2003). Characterization of homologies of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Molecular Plant Pathology*, 4 (2), pp. 109-114.

Neimark, H., & Kirkpatrick, B. C. (1993). Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic Mycoplasma-like organisms. *Molecular Microbiology*, 7, pp. 21-28.

Nicolić, P., Mehle, N., Gruden, K., Ravnikar, M., & Dermastia, M. (2010). A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Molecular and Cellular Probes* 24, pp. 303-309.

Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., HeeYoung, J., Kuboyama, T., Miyata, S., et al. (2002). A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298, pp. 195-201.

OEPP. (09 de 2011). *Lista A2 de pragas de quarentena*. Obtido em 25 de Setembro de 2011, de <http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm>

Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, J., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., et al. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36, pp. 27-29.

Padovan, A. C., Firrao, G., Schneider, B., & Gibb, K. S. (2000). Chromosome mapping of the sweet potato little leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. *Microbiology* 146, pp. 893-902.



- Pasqualini, E., Civolani, S., Musacchi, S., Ancarani, V., & Dondini, L. (2006). *Cacopsylla pyri* behaviour on new pear selections for host resistance programs. *Bulletin of Insectology* 59 , pp. 27-37.
- Pecho, L., & Vizarova, G. (1990). Plant hormones in tissues of healthy and mycoplasma-infected currants. *Ochrana Rostlin*, 26 , pp. 181-186.
- Pictorial key of central European Cacopsylla associated with rosaceae*. (2010). Obtido de Psyllid Key: <http://www.psyllidkey.eu/species.html>
- Powell, K. S., Gatehouse, A., Hilder, V. A., Van Damme, E., Peumans, W. J., Boonjawat, J., et al. (1995). Different antimetabolite effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 75 , pp. 61-65.
- Power, A. G. (1992). Host plant dispersion, leafhopper movement and disease transmission. *Ecological Entomology*, 17 , pp. 63-68.
- Salvianti, F., Bettini, P. P., Giordani, E., P., S., Bellini, E., & Buiatti, M. (2008). Identification by suppression subtractive hybridization of genes expressed in pear (*Pyrus* spp.) upon infestation with *Cacopsylla pyri* (Homoptera:Psyllidae). *Journal of Plant Physiology* 165 , pp. 1808-1816.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C., & Seemüller, E. (1993). Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139 , pp. 519-527.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., & Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology* , pp. 369-380.
- Schneider, H. (1970). Graft transmission and host range of pear decline causal agent. *Phytopathology* , pp. 204-207.
- Schneider, H. (1976). Indicator Hosts for Pear Decline Symptomatology, Histopathology and Distribution of Mycoplasma-like Organisms in Leaf Veins. *Cytology and Histology* , pp. 592-601.
- Seemüller, E., & Schneider, B. (2004). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 , pp. 1217-1226.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., & Göschl, M. (1998). Current status of molecular classification of the Phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* , pp. 3-26.
- Seidl, V., & Komárková. (1974). Studies on natural spread of proliferation disease of apple. *Phytopathologische Zeitschrift*, 81 , pp. 301-313.
- Severin, H. (1946). Longevity, or life histories, of leafhopper species on virus-infected and on healthy plants. *Hilgardia* 17 , pp. 121-133.
- Sousa, E. (2005). Diagnose e controlo dos principais vírus que afectam a videira para fins de propagação vegetativa. Apreciação da sua importância e contribuição para o seu desenvolvimento. *Dissertação apresentada para acesso à categoria de Investigador auxiliar* , 248. DGPC, Oeiras.

Süle, S., Jenser, G., & Szita, É. (2007). Management of pear decline caused by 'Candidatus Phytoplasma pyri' in Hungary. *Bulletin of Insectology* 60 , pp. 319-320.

Tedeschi, R., Ferrato, V., Rossi, J., & Alma, A. (2006). Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology*, 55 , pp. 18-24.

The IRPCM Phytoplasma/Spyroplasma working Team - Phytoplasm taxonomy group. (2004). Candidatus phytoplasma, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 54 , pp. 1243-1255.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22 , pp. 4673-4680.

Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C., & Martín, M. P. (2005). Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19 , pp. 334-340.

Toth, K. F., Harrison, N., & Sears, B. B. (1994). Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from rps3 gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* , pp. 119-124.

Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H. Y., Nishigawa, H., Miyata, S., et al. (2004). In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology*, 94 , pp. 244-250.

Weintraub, P. G. (2007). Insect vectors of phytoplasmas and their control – an update. *Bulletin of Insectology* , pp. 169-173.

Weintraub, P. G., & Beanland, L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51 , pp. 91-111.

Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J. P., Oyaizu, H., Yang, D., et al. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 171 , pp. 6455-6467.

Whittaker, R. H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science* 163 , pp. 150-161.

Wiedbrawk, D. L., & Farks, D. H. (1999). In *Molecular methods for virus detection*. Londres, Inglaterra: Academic Press.

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 , pp. 4576-4579.

Yvon, M., Thébaud, G., Alary, R., & Labonne, G. (2009). Specific detection and quantification of the phytopathogenic agent 'Candidatus Phytoplasma prunorum'. *Molecular and Cellular Probes* 23 , pp. 227-234.